

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-000269

(43)Date of publication of application : 07.01.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

C12N 9/02

C12P 7/42

C12P 17/00

(21)Application number : 2001-270878

(71)Applicant : KIRIN BREWERY CO LTD

(22)Date of filing : 06.09.2001

(72)Inventor : MISAWA NORIHIKO
SHINDO KAZUTOSHI
OKAZAKI HIROSHI
FURUKAWA KENSUKE
HORINOUCI SUEJI

(30)Priority

Priority number : 2000279703

Priority date : 14.09.2000

Priority country : JP

(54) METHOD FOR PRODUCING HYDROXYLATED HETEROCYCLIC COMPOUND AND HYDROXYLATED AROMATIC CARBOXYLIC ACID, AND MODIFIED AROMATIC RING DIOXYGENASE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for bionically producing a hydroxylated heterocyclic compound and a hydroxylated aromatic carboxylic acid, and to obtain a modified enzyme which can be used for the method.**SOLUTION:** The method for producing the hydroxylated heterocyclic compound or the hydroxylated aromatic carboxylic acid comprises reacting an aromatic ring dioxygenase with a heterocyclic compound or an aromatic carboxylic acid to hydroxylate the heterocyclic compound or the aromatic carboxylic acid. The enzyme is preferably an aromatic ring dioxygenase comprising the tetramer of a β -subunit, ferredoxin, ferredoxin reductase and an α -subunit comprising an amino acid sequence modified according to the α -subunit of a biphenyldioxygenase originated from *Burkholderia cepacia* LB400 strain.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-269

(P2003-269A)

(43) 公開日 平成15年1月7日 (2003.1.7)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テグコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 9/02	4 B 0 2 4
9/02		C 1 2 P 7/42	4 B 0 5 0
C 1 2 P 7/42		17/00	4 B 0 6 4
17/00		C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数57 O L (全 44 頁)

(21) 出願番号 特願2001-270878(P2001-270878)

(22) 出願日 平成13年9月6日 (2001.9.6)

(31) 優先権主張番号 特願2000-279703(P2000-279703)

(32) 優先日 平成12年9月14日 (2000.9.14)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000253503

麒麟麦酒株式会社

東京都中央区新川二丁目10番1号

(72) 発明者 三 沢 典 彦

神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟

麦酒株式会社基盤技術研究所内

(72) 発明者 新 藤 一 敏

群馬県高崎市宮原町3 麒麟麦酒株式会社

医薬探索研究所内

(74) 代理人 100075812

弁理士 吉武 賢次 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 水酸化された複素環化合物および芳香族カルボン酸の製造法および改変された芳香環ジオキシゲナーゼ

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 水酸化された複素環化合物および芳香族カルボン酸を生物工学的に生産する方法、並びにこの方法に用いることができる改変酵素の提供。

【解決手段】 本発明による水酸化された複素環化合物または芳香族カルボン酸の製造法は、芳香環ジオキシゲナーゼを複素環化合物または芳香族カルボン酸と反応させることにより、これらの化合物を水酸化することを含んでなるもの、である。本発明による酵素は、*Burkholderia cepacia* LB400 株由来のピフェニルジオキシゲナーゼの α サブユニットに従って改変がなされたアミノ酸配列からなる α サブユニットと、 β サブユニット、フェレドキシンおよびフェレドキシンレダクターゼの4量体からなる芳香環ジオキシゲナーゼである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】芳香環ジオキシゲナーゼを複素環化合物または芳香族カルボン酸と反応させることにより、複素環化合物または芳香族カルボン酸を水酸化することを含んでなる、水酸化された複素環化合物または水酸化された芳香族カルボン酸の製造法。

【請求項 2】芳香環ジオキシゲナーゼが、芳香環ジオキシゲナーゼ大サブユニット（ α サブユニット）、芳香環ジオキシゲナーゼ小サブユニット（ β サブユニット）、フェレドキシン、およびフェレドキシンレダクターゼからなる 4 量体である、請求項 1 に記載の製造法。

【請求項 3】芳香環ジオキシゲナーゼが *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 由来である、請求項 2 に記載の製造法。

【請求項 4】 α サブユニットが、配列番号 2 のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 2 のアミノ酸配列からなり、

β サブユニットが、配列番号 4 のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 4 のアミノ酸配列からなり、

フェレドキシンが、配列番号 6 のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 6 のアミノ酸配列からなり、

フェレドキシンレダクターゼが、配列番号 8 のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 8 のアミノ酸配列からなり、かつ α サブユニット、 β サブユニット、フェレドキシン、およびフェレドキシンレダクターゼからなる 4 量体が芳香環ジオキシゲナーゼ活性を有する、請求項 2 に記載の製造法。

【請求項 5】 α サブユニットが、配列番号 2 のアミノ酸配列からなり、

β サブユニットが、配列番号 4 のアミノ酸配列からなり、

フェレドキシンが、配列番号 6 のアミノ酸配列からなり、

フェレドキシンレダクターゼが、配列番号 8 のアミノ酸配列からなる、請求項 2 に記載の製造法。

【請求項 6】 α サブユニットが、置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 2 のアミノ酸配列からなり、かつ *Burkholderia cepacia* LB400 株由来のビフェニルジオキシゲナーゼの α サブユニットのアミノ酸配列に従って改変がなされており、

β サブユニットが、配列番号 4 のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 4 のアミノ酸配列からなり、

フェレドキシンが、配列番号 6 のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 6 のアミノ酸配列からなり、

フェレドキシンレダクターゼが、配列番号 8 のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 8 のアミノ酸配列からなり、かつ α サブユニット、 β サブユニット、フェレドキシン、およびフェレドキシンレダクターゼからなる 4 量体が芳香環ジオキシゲナーゼ活性を有する、請求項 2 に記載の製造法。

【請求項 7】*Burkholderia cepacia* LB400 株由来の α サブユニットのアミノ酸配列が、配列番号 11 に記載のアミノ酸配列である、請求項 6 に記載の製造法。

【請求項 8】改変を有する配列番号 2 のアミノ酸配列が、配列番号 10 のアミノ酸配列である、請求項 6 に記載の製造法。

【請求項 9】芳香環ジオキシゲナーゼ遺伝子を発現するように形質転換された微生物を培養することにより得られた培養物を複素環化合物または芳香族カルボン酸と反応させることにより、複素環化合物または芳香族カルボン酸を水酸化することの特徴とする、請求項 1 に記載の製造法。

【請求項 10】芳香環ジオキシゲナーゼ遺伝子が、芳香環ジオキシゲナーゼ大サブユニット（ α サブユニット）、芳香環ジオキシゲナーゼ小サブユニット（ β サブユニット）、フェレドキシン、およびフェレドキシンレダクターゼからなる 4 量体をコードする DNA 配列からなる、請求項 9 に記載の製造法。

【請求項 11】芳香環ジオキシゲナーゼ遺伝子が *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 由来である、請求項 10 に記載の製造法。

【請求項 12】 α サブユニットが、配列番号 2 のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 2 のアミノ酸配列からなり、

β サブユニットが、配列番号 4 のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 4 のアミノ酸配列からなり、

フェレドキシンが、配列番号 6 のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 6 のアミノ酸配列からなり、

フェレドキシンレダクターゼが、配列番号 8 のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 8 のアミノ酸配列からなり、かつ α サブユニット、 β サブユニット、フェレドキシン、およびフェレドキシンレダクターゼからなる 4 量体が芳香環ジオキシゲナーゼ活性を有する

る、請求項 10 に記載の製造法。

【請求項 13】 α サブユニットが、配列番号 2 のアミノ酸配列からなり、

β サブユニットが、配列番号 4 のアミノ酸配列からなり、

フェレドキシンが、配列番号 6 のアミノ酸配列からなり、

フェレドキシンレダクターゼが、配列番号 8 のアミノ酸配列からなる、請求項 10 に記載の製造法。

【請求項 14】 α サブユニットをコードする DNA 配列が、配列番号 1 の DNA 配列であり、

β サブユニットをコードする DNA 配列が、配列番号 3 の DNA 配列であり、

フェレドキシンをコードする DNA 配列が、配列番号 5 の DNA 配列であり、

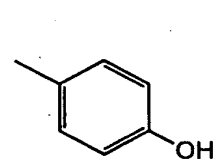
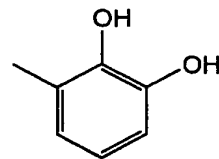
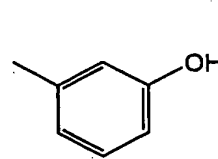
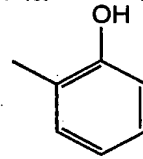
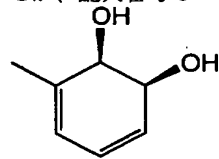
フェレドキシンレダクターゼをコードする DNA 配列が、配列番号 7 の DNA 配列である、請求項 10 または 13 に記載の製造法。

【請求項 15】 α サブユニットが、置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 2 のアミノ酸配列からなり、かつ *Burkholderia cepacia* LB400 株由来のピフェニルジオキシゲナーゼの α サブユニットのアミノ酸配列に従って改変がなされており、

β サブユニットが、配列番号 4 のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 4 のアミノ酸配列からなり、

フェレドキシンが、配列番号 6 のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 6 のアミノ酸配列からなり、

フェレドキシンレダクターゼが、配列番号 8 のアミノ酸



のいずれかを表す) で表される、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の製造法。

【請求項 21】Het が、キノリン、インドール、インダノン、ベンゾチアゾール、ベンゾキサゾール、ピリジン、3-メチルピリジン、ピリミジン、ピロール、ピラゾール、3-メチルピラゾール、イミダゾール、イソチ

配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 8 のアミノ酸配列からなり、かつ α サブユニット、 β サブユニット、フェレドキシン、およびフェレドキシンレダクターゼからなる 4 量体が芳香環ジオキシゲナーゼ活性を有する、請求項 10 に記載の製造法。

【請求項 16】*Burkholderia cepacia* LB400 株由来の α サブユニットのアミノ酸配列が、配列番号 11 に記載のアミノ酸配列である、請求項 15 に記載の製造法。

【請求項 17】改変を有する配列番号 2 のアミノ酸配列が、配列番号 10 のアミノ酸配列である、請求項 15 に記載の製造法。

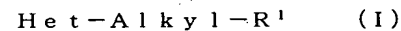
【請求項 18】 α サブユニットをコードする DNA 配列が、配列番号 9 の DNA 配列であり、

β サブユニットをコードする DNA 配列が、配列番号 3 の DNA 配列であり、

フェレドキシンをコードする DNA 配列が、配列番号 5 の DNA 配列であり、

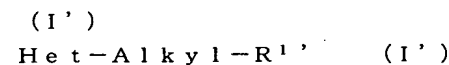
フェレドキシンレダクターゼをコードする DNA 配列が、配列番号 7 の DNA 配列である、請求項 10 または 17 に記載の製造法。

【請求項 19】複素環化合物が、式 (I)



(式中、Het は複素環式基を表し、Alkyl は結合または炭素数 1 ~ 4 の分岐していてもよいアルキレン鎖を表し、 R^1 は非置換フェニル基を表す)、で表される、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の製造法。

【請求項 20】水酸化された複素環化合物が、式

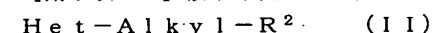


(式中、Het および Alkyl は請求項 19 で定義した内容と同義であり、 $\text{R}^{1'}$ は下記基：

【化 1】

アゾール、ベンゾフラン、チオフェン、クロモン (4H-クロメン-4-オン)、クロマン-4-オン、6-ヒドロキシクロマン-4-オン、またはフタルイミドを表す、請求項 19 または 20 に記載の製造法。

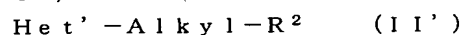
【請求項 22】複素環化合物が、式 (II)



(式中、Het は複素環式基を表し、Alkyl は結合または炭素数 1~4 の分岐していてもよいアルキレン鎖を表し、R² は C₁₋₄ アルキル基または水酸基により置換されたフェニル基を表す) で表される、請求項 1~18 のいずれか一項に記載の製造法。

【請求項 23】 Het がベンゾキサゾールまたはピリジンを表し、R² が 2-ヒドロキシフェニルまたは 4-メチルフェニルを表す、請求項 22 に記載の製造法。

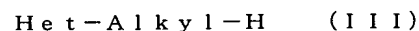
【請求項 24】 水酸化された複素環化合物が、式 (I I')



(式中、R² および Alkyl は請求項 22 で定義した内容と同義であり、Het' は 1 または 2 の水酸基により置換された複素環式基を表す) で表される、請求項 1~18、22、および 23 のいずれか一項に記載の製造法。

【請求項 25】 Het' が 4, 5-ジヒドロキシ-4, 5-ジヒドロベンゾキサゾールまたは 3-ヒドロキシピリジンである、請求項 24 に記載の製造法。

【請求項 26】 複素環化合物が、式 (I I I)



複素環化合物

2-フェニルキノリン

2-フェニルインドール

2-フェニルインドール

2-フェニルインドール

3-フェニル-1-インダノン

2-フェニルベンゾチアゾール

2-フェニルベンゾキサゾール

2-フェニルピリジン

3-メチル-2-フェニルピリジン

4-フェニルピリミジン

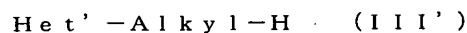
1-フェニルピロール

1-フェニルピラゾール

(式中、Het は複素環式基を表し、Alkyl は炭素数 1~8 の分岐していてもよいアルキレン鎖を表す) で表される、請求項 1~18 のいずれか一項に記載の製造法。

【請求項 27】 Het がベンゾフランまたはチオフェンを表す、請求項 26 に記載の製造法。

【請求項 28】 水酸化された複素環化合物が、式 (I I I')



(式中、Het' は 1 または 2 の水酸基により置換された複素環式基を表し、Alkyl は請求項 26 で定義した内容と同義である) で表される、請求項 1~18、26、および 27 のいずれか一項に記載の製造法。

【請求項 29】 Het' が 3-ヒドロキシベンゾフラン、4-ヒドロキシベンゾフラン、または 2, 3-ジヒドロキシ-2, 3-ジヒドロチオフェンを表す、請求項 28 に記載の製造法。

【請求項 30】 複素環化合物および水酸化された複素環化合物が、下記組み合わせから選択される、請求項 1~18 のいずれか一項に記載の製造法。

水酸化された複素環化合物

3-(2-キノリル)-3, 5-

シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール

3-(1H-2-インドリル)-3, 5-

シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール

2-(1H-2-インドリル)フェノール

2-フェニル-1H-5-インドロール

3-(5, 6-ジヒドロキシ-1, 3-シクロヘキサジエンル)-1-

インダノン

3-(1, 3-ベンゾチアゾール-2-

イル)-3, 5-シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール

3-(1, 3-ベンゾオキサゾール-2-

イル)-3, 5-シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール

3-(2-ピリジル)-3, 5-

シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール

3-(3-メチルピリド-2-イル)-

-3, 5-シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール

3-(4-ピリミジニル)-3, 5-

シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール

3-(1H-1-ピロリル)-3, 5-

シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール

4-ヒドロキシ-1-フェニルピラ

ゾール

3-メチル-1-フェニルピラゾール	3-(3-メチルピラゾール-1-イル)-3, 5-シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール
3-メチル-1-フェニルピラゾール	2-(3-メチルピラゾール-1-イル)フェノール
2-ベンジルピリジン	3-(2-ピリジルメチル)-3, 5-シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール
1-ベンジルイミダゾール	3-(1H-1-イミダゾリルメチル)-3, 5-シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール
4-ベンジルイソチアゾール	3-(4-イソチアゾリルメチル)-3, 5-シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール
4-ベンジルイソチアゾール	2-(4-イソチアゾリルメチル)フェノール
2-(2-ヒドロキシフェニル)ベンゾキサゾール	2-(2-ヒドロキシフェニル)-4, 5-ジヒドロ-1, 3-ベンゾオキサゾール-4, 5-ジオール
2-(p-トリル)ピリジン	2-(4-メチルフェニル)-3-ピリジオール
2-n-ブチルベンゾフラン	2-ブチルベンゾ [b] フラン-6-オール
2-n-ブチルベンゾフラン	2-ブチルベンゾ [b] フラン-5-オール
3-n-ヘキシルチオフェン	4-ヘキシル-2, 3-ジヒドロ-2, 3-チオフェンジオール
フラボン	2', 3'-ジヒドロキシフラボン
フラボン	3'-ヒドロキシフラボン
フラバノン	2', 3'-ジヒドロキシフラバノン
フラバノン	2'-ヒドロキシフラバノン
フラバノン	3'-ヒドロキシフラバノン
6-ヒドロキシフラバノン	2', 6-ジヒドロキシフラバノン
6-ヒドロキシフラバノン	3', 6-ジヒドロキシフラバノン
2-(1-フェニルエチル)-1, 3-イソインドールイネジオン	2-[1-(4-ヒドロキシフェニル)エチル]-1, 3-イソインドールイネジオン
2-(1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-1-ナフタレニル)-1, 3-イソインドールイネジオン	2-(4-ヒドロキシ-1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-1-ナフタレニル)-1, 3-イソインドールイネジオン

【請求項 3 1】複素環化合物がフラボノイドである、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の製造法。

【請求項 3 2】フラボノイドが、フラボン、フラバノン、または 6-ヒドロキシフラバノンである、請求項 3 1 に記載の製造法。

【請求項 3 3】水酸化されたフラボノイドが、2', 3'-ジヒドロキシ体、2'-ヒドロキシ体または 3'-ヒドロキシ体である請求項 3 1 または 3 2 に記載の製造法。

【請求項 3 4】水酸化されたフラボノイドが、2',

3'-ジヒドロキシフラボン、3'-ヒドロキシフラボン、2', 3'-ジヒドロキシフラバノン、2', -ヒドロキシフラバノン、3'-ヒドロキシフラバノン、2', 6-ジヒドロキシフラバノン、または 3', 6-ジヒドロキシフラバノンである、請求項 3 3 に記載の製造法。

【請求項 3 5】フラボノイドおよび水酸化されたフラボノイドが、下記組み合わせから選択される、請求項 3 1～3 4 のいずれか一項に記載の製造法。

フラボノイド	水酸化されたフラボノイド
フラボン	2', 3'-ジヒドロキシフラボン
フラボン	3'-ヒドロキシフラボン
フラバノン	2', 3'-ジヒドロキシフラバノン
フラバノン	2'-ヒドロキシフラバノン
フラバノン	3'-ヒドロキシフラバノン
6-ヒドロキシフラバノン	2', 6-ジヒドロキシフラバノン
6-ヒドロキシフラバノン	3', 6-ジヒドロキシフラバノン

【請求項 36】複素環化合物が芳香環を有するフタルイミド誘導体である、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の製造法。

【請求項 37】芳香環を有するフタルイミド誘導体が、2-(1-フェニルエチル)-1, 3-イソインドールイネジオンまたは 2-(1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-1-ナフタレニル)-1, 3-イソインドールイネジオンである、請求項 36 に記載の製造法。

【請求項 38】水酸化された芳香環を有するフタルイミド誘導体が、芳香環内またはベンジル位におけるヒドロキシ体である、請求項 36 または 37 に記載の製造法。

芳香環を有するフタルイミド
誘導体

2-(1-フェニルエチル)-1, 3-
イソインドールイネジオン

2-(1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-1-
ナフタレニル)-1, 3-イ
ソインドールイネジオン

【請求項 41】芳香族カルボン酸が、式 (IV)
 $R^3-alkyl-COOR^4$ (IV)

(式中、 R^3 は非置換炭素環式基を表し、 $alkyl$ は結合または炭素数 1～4 の分岐していてもよいアルキレン鎖を表し、 R^4 は水素原子またはカルボキシル基の保護基を表す)、で表される、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の製造法。

【請求項 42】 R^3 がナフタレンである、請求項 41 に記載の製造法。

【請求項 43】式 (IV) の化合物が、1-ナフトイック酸または 1-ナフチル酢酸である、請求項 41 に記載の製造法。

【請求項 44】水酸化された芳香族カルボン酸が、式 (IV')

芳香族カルボン酸

1-ナフトイック酸

1-ナフチル酢酸

1-ナフチル酢酸

【請求項 48】微生物が、大腸菌、放線菌または酵母である、請求項 1～47 のいずれか一項に記載の製造法。

【請求項 49】置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 2 のアミノ酸配列であって、*Burkholderia cepacia* LB400 株

水酸化された芳香環を有する
フタルイミド誘導体

2-[1-(4-ヒドロキシフェニル)
エチル]-1, 3-イソインドールイ
ネジオン

2-(4-ヒドロキシ-1, 2, 3, 4-
テトラヒドロ-1-ナフタレニル)
-1, 3-イソインドールイネジオン

$R^{3'}-alkyl-COOR^4$ (IV')

(式中、 $alkyl$ および R^4 は前記で定義した内容と同義であり、 $R^{3'}$ は 1 または 2 の水酸基により置換された炭素環式基を表す) で表される、請求項 1～18 および 41～43 のいずれか一項に記載の製造法。

【請求項 45】 $R^{3'}$ が 1 または 2 の水酸基により置換されたナフタレンである、請求項 44 に記載の製造法。

【請求項 46】式 (IV') の化合物が、4-ヒドロキシ-1-ナフトイック酸、4-ヒドロキシ-1-ナフチル酢酸、または 5-ヒドロキシ-1-ナフチル酢酸である、請求項 44 に記載の製造法。

【請求項 47】芳香族カルボン酸および水酸化された芳香族カルボン酸が、下記組み合わせから選択される、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の製造法。

水酸化された芳香族カルボン酸

4-ヒドロキシ-1-ナフトイック酸

4-ヒドロキシ-1-ナフチル酢酸

5-ヒドロキシ-1-ナフチル酢酸

由来の α サブユニットのアミノ酸配列に従って改変がなされたアミノ酸配列からなる α サブユニット、配列番号 4 のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 4 のアミノ酸配列からなる β サブユニット、

配列番号 6 のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 6 のアミノ酸配列からなるフェレドキシン、および配列番号 8 のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される 1 以上の改変を有する配列番号 8 のアミノ酸配列からなるフェレドキシンレダクターゼを含んでなる芳香環ジオキシゲナーゼ。

【請求項 50】 α サブユニットが配列番号 10 に記載のアミノ酸配列からなる、請求項 49 に記載の芳香環ジオキシゲナーゼ。

【請求項 51】請求項 49 または 50 に記載の芳香環ジオキシゲナーゼをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 52】配列番号 10 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項 53】請求項 52 に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 54】芳香環ジオキシゲナーゼを複素環化合物または芳香族カルボン酸と反応させることを含んでなる、複素環化合物または芳香族カルボン酸に水酸基を導入する方法。

【請求項 55】芳香環ジオキシゲナーゼが請求項 49 または 50 に記載のものである、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】芳香環ジオキシゲナーゼを含んでなる、複素環化合物または芳香族カルボン酸を水酸化するための組成物。

【請求項 57】芳香環ジオキシゲナーゼが請求項 49 または 50 に記載のものである、請求項 56 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】発明の分野

本発明は、水酸基が導入された複素環化合物および水酸基が導入された芳香族カルボン酸の製造法、および複素環化合物および芳香族カルボン酸を水酸化する新規改変酵素に関し、更に詳細には、組換え大腸菌や組換え放線菌等の組換え微生物を用いて複素環化合物等に水酸基を導入する生物工学的変換技術に関する。

【0002】関連技術

今日の医薬品研究開発においては、まず創薬のターゲットとするべき疾患関連分子(創薬標的分子)を明らかにした後、その創薬標的分子を用いて何らかの生物活性を指標に高速化スクリーニング(ハイスルーブット・スクリーニング)を行い、ヒットする化合物を探すという方法がよく取られる。この際に、経口用医薬品に繋げるためのリード化合物(通常、分子量が100-700位の脂質性化合物)のスクリーニングソースのライブラリーが必要となる。このライブラリーの質と量が医薬品研究開発に重要であると考えられている。

【0003】現在、スクリーニングソースのライブラリーはコンビナトリアルケミストリー等の有機化学技術によって化学合成されたものが主流を占めている(田中昭弘, 創薬とコンビナトリアルケミストリー, 蛋白質 核酸 酵素, 45, 887-894, 2000)。微生物代謝産物等の天然物由来のライブラリーも 経口用医薬品の研究開発に用いられているが、偽ヒット体(false positive)が多い、活性物質の特定に時間がかかる、新規化合物が見つかりにくい等の理由で、天然物由来のものが占める割合は少なくなりつつある。

【0004】一方、化学合成されたスクリーニングソースのライブラリーはそれ特有の偏りを有している場合が多い。化学合成法では、 $-NHCO-$ 結合を介して2つの前駆体を結合させる反応のような結合反応は容易であるが、水酸基などの官能基をある化合物の特定の位置に導入したり立体特異的に導入したりするのは困難である。また、医薬品研究開発において、HTSにより 創薬標的分子に作用するリード化合物が発見された後には、そのリード化合物の類縁体を作り 最適な開発候補化合物を見出す必要がある(リード最適化)。このリード化合物の類縁体作製に際しても、現在は化学合成法が主流であり、有機化学反応特有の偏りを有していると見ることができる。

【0005】ところで、複素環式基はほとんどの経口用医薬品や合成染料、半数以上の天然有機化合物に含まれている。したがって、経口用医薬品またはドラッグライク化合物の合成を行う上だけでなく、これらや他の化成品に繋げるための化学合成法の初発構成単位であるビルディングブロックの合成を行う上で、複素環化合物に水酸基などの官能基を特異的に導入する生物工学的変換技術はきわめて重要で、必要性の高い技術であると言える。

【0006】また、ビルディングブロックとしてアミンとカルボン酸の組み合わせがもっともよく用いられており、その中でも特に、芳香環を分子内に有するアミン体(以後、芳香族アミンという)や芳香環を分子内に有するカルボン酸(以下、芳香族カルボン酸という)が頻繁に使われている。したがって、芳香環アミンや芳香環カルボン酸に水酸基などの官能基を特異的に導入する生物工学的変換技術もきわめて重要で、必要性の高い技術であると言える。

【0007】*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 株は、九州大学農学部 古川謙介らにより北九州で単離されたポリ塩化ビフェニル(PCB)分解菌である。PCBの最初の酸化を担う酵素である芳香環ジオキシゲナーゼをコードする遺伝子が *P. pseudoalcaligenes* KF707 から単離され、ビフェニル ジオキシゲナーゼ(biphenyl 1 dioxygenase) 遺伝子 (*bphA1A2A3A4* 遺伝子) と命名された(A. Suyama, R. Iwakiri, N. Kimura, A. Nishi, K. Nakamura, K. Furukawa, J. Bacteriol., 178, 403

9-4046, 1996)。 *P. pseudoalcaligenes* KF707 株は、ビフェニル、4-メチルビフェニル、または ジフェニルメタン (diphenylmethane) を炭素源とする培地で生育することができたが、ベンゼンやトルエンを炭素源とする培地では生育できなかった (A. Suyama, R. Iwakiri, N. Kimura, A. Nishi, K. Nakamura, K. Furukawa, J. Bacteriol., 178, 4039-4046, 1996)。この差は、最初の酸化反応を行うビフェニルジオキシゲナーゼの基質特異性に起因していると観ることができる。

【0008】 *Burkholderia cepacia* LB400 株 (以前は *Pseudomonas* sp. LB400株と呼ばれていた) は、Johnsonらによりニューヨーク州で単離されたポリ塩化ビフェニル分解菌である (Bedard, D.L., Unterman, R., Bopp, L.H., Brennan, M.J., Haberl, M.L., Johnson, C., Appl. Environ. Microbiol., 51, 761-768, 1986)。 *B. cepacia* LB400 株は 強力な PCB 分解菌として、 *P. pseudoalcaligenes* KF707株とともに、関連遺伝子や関連酵素の解析も含めて研究されてきた。 *B. cepacia* LB400 においても、最初の酸化を担う酵素である芳香環ジオキシゲナーゼをコードする遺伝子が単離され、ビフェニルジオキシゲナーゼ (biphenyl dioxygenase) 遺伝子 (*bphAEG* 遺伝子) と命名された (B. D. Erickson, E. J. Mondello, J. Bacteriol., 174, 2903-2912, 1992)。

【0009】 *P. pseudoalcaligenes* KF707と *B. cepacia* LB400 のビフェニルジオキシゲナーゼ (BD0) は、アミノ酸配列レベルで きわめて高いホモロジーを有していた。すなわち、大サブユニット 94%、小サブユニット 99%、フェレドキシン 100%、フェレドキシンレダクターゼ 100%であった。それにもかかわらず、両者の基質特異性や反応特異性は異なっていた。例えば、2,5,4'-トリクロロビフェニル (2,5,4'-trichlorobiphenyl) を基質とした場合、 *P. pseudoalcaligenes* KF707 のビフェニルジオキシゲナーゼ (BD0) は、本基質の2',3'位に酸素を添加し *cis*-ジオールを生成した (図1参照) が、 *B. cepacia* LB400 のBD0は 本基質の3,4位に酸素を添加し *cis*-ジオールを生成した (図2参照) (N. Kimura, A. Nishi, M. Goto, K. Furukawa, J. Bacteriol., 179, 3936-3943, 1997)。また、KF707株のBD0はジフェニルメタンを基質として認識し変換できたのに対して、LB400株のBD0はこれを基質として認識し変換することはできなかった。一方、2,5,2',5'-テトラクロロビフェニルの場合は、LB400株のBD0はこれを基質として認識し変換できた (図2) のに対して、KF707株のBD0は基質として認識し変換することはできなかった。

【0010】九州大学の古川 謙介らは、LB400株由来のビフェニルジオキシゲナーゼ 大サブユニットをコードするDNA、および、KF707株由来のビフェニルジオキシゲナーゼの大サブユニットをコードするDNAを、共通のフランキンギン配列からなる *bphA1* プライマーを用いたPCRにより単離した。次に、これらをDnaseIで分解し、10

—50 bp DNA断片を回収、混合し、セルフプライミングPCR, *bphA1* プライマーを加えたPCRを行い、ランダムにアミノ酸配列が入れ替わった種々のキメラ *bphA1* を得た [DNA シャフリング (DNA shuffling)]。これらのキメラ *bphA1* を *P. pseudoalcaligenes* KF707由来のビフェニルジオキシゲナーゼの大サブユニット以外の3つの構成要素 (*bphA2A3A4*) の上流に繋ぎ、種々の改変ビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子 (modified *bphA1::bphA2A3A4* 遺伝子) を得ることが可能であることが報告されている (T. Kumamaru, H. Suenaga, M. Mitsuoka, T. Watanabe, K. Furukawa, Nature Biotechnology, 16, 663-666, 1998)。

【0011】しかしながら、芳香環ジオキシゲナーゼが複素環化合物および芳香族カルボン酸に水酸基を導入できることは現在まで知られていない。また、これらの複素環化合物や芳香族カルボン酸に水酸基を特異的に導入できる酵素も現在まで知られていない。

【0012】

【発明の概要】本発明者らは今般、 *P. pseudoalcaligenes* KF707 株由来のビフェニルジオキシゲナーゼを用いると、分子内に複素環基を有する化合物や芳香族カルボン酸に反応特異的に水酸基を導入することができることを見い出した。

【0013】本発明者らはまた、 *P. pseudoalcaligenes* KF707 株由来のビフェニルジオキシゲナーゼにおける大サブユニットをコードするDNAを、 *Burkholderia cepacia* LB400株由来のビフェニルジオキシゲナーゼの大サブユニットをコードするDNAとの間でDNAシャフリング (DNA shuffling) を行い、得られたDNAと *P. pseudoalcaligenes* KF707由来のビフェニルジオキシゲナーゼの大サブユニット以外の3つの構成要素をコードするDNAとからなる改変ビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子を発現させ、このようにして得られた改変芳香環ジオキシゲナーゼを用いると分子内に複素環基を有する化合物や芳香族カルボン酸に反応特異的に水酸基を導入することができることを見い出した。

【0014】本発明は、水酸化された複素環化合物や水酸化された芳香族カルボン酸を生物工学的に生産する方法の提供をその目的とする。

【0015】本発明による水酸化された複素環化合物または水酸化された芳香族カルボン酸の製造法は、芳香環ジオキシゲナーゼを複素環化合物または芳香族カルボン酸と反応させることにより、これらの化合物を水酸化することを含んでなるもの、である。

【0016】本発明による製造法によれば、水酸化された複素環化合物および水酸化された芳香族カルボン酸を安価にかつ容易に製造することができる。

【0017】本発明はまた、複素環化合物および芳香族カルボン酸を効率的に水酸化することができる改変酵素を提供する事をその目的とする。

【0018】本発明による改変酵素は、置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される1以上の改変を有する配列番号2のアミノ酸配列であって、Burkholderia cepacia LB400 株由来のピフェニルジオキシゲナーゼの α サブユニットのアミノ酸配列に従って改変がなされたアミノ酸配列からなる α サブユニット、配列番号4のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される1以上の改変を有する配列番号4のアミノ酸配列からなる β サブユニット、配列番号6のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される1以上の改変を有する配列番号6のアミノ酸配列からなるフェレドキシン、および配列番号8のアミノ酸配列または置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される1以上の改変を有する配列番号8のアミノ酸配列からなるフェレドキシンレダクターゼからなる4量体からなる、改変された芳香環ジオキシゲナーゼである。

【0019】本発明は更に、複素環化合物および芳香族カルボン酸を効率的に水酸化するように改変された芳香環ジオキシゲナーゼの α サブユニットを提供する事をその目的とする。

【0020】本発明による芳香環ジオキシゲナーゼの改変 α サブユニットは、置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される1以上の改変を有する配列番号2のアミノ酸配列であって、Burkholderia cepacia LB400 株由来のピフェニルジオキシゲナーゼの α サブユニットのアミノ酸配列に従って改変がなされたアミノ酸配列からなるもの、である。

【0021】

【発明の具体的説明】微生物の寄託

Pseudomonas pseudoalcaligenes KF707 由来の芳香環ジオキシゲナーゼ遺伝子を組み込んだ大腸菌JM109 (pKF6622) は、2000年9月13日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託された。受託番号は、FERM BP-7300である。

【0022】改変された芳香環ジオキシゲナーゼ遺伝子を組み込んだ大腸菌JM109 (pKF2072) は、2000年9月13日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託された。受託番号は、FERM BP-7299である。

【0023】芳香環ジオキシゲナーゼおよびその遺伝子芳香環ジオキシゲナーゼは、ベンゼン環のような芳香環に作用し、2原子の分子状酸素を芳香環上に導入できる酵素を意味する。2原子からなる分子状酸素が芳香環上に導入された結果、芳香環上に2つの水酸基が導入されることとなる。

【0024】芳香環ジオキシゲナーゼは、芳香環ジオキシゲナーゼ大サブユニット (α サブユニット) (BphA

1)、芳香環ジオキシゲナーゼ小サブユニット (β サブユニット) (BphA2)、フェレドキシン (ferredoxin) (BphA3)、およびフェレドキシンレダクターゼ (ferredoxin reductase, 別名: NAD(P)H-ferredoxin reductase) (BphA4) からなる4つのサブユニット (テトラマー) からなることができる。

【0025】本発明においては、芳香環ジオキシゲナーゼは (1) Pseudomonas pseudoalcaligenes 由来の芳香環ジオキシゲナーゼおよび芳香環ジオキシゲナーゼ活性を依然として有するその改変体、および (2) Burkholderia cepacia LB400 株由来のピフェニルジオキシゲナーゼに従って α サブユニットが改変されたPseudomonas pseudoalcaligenes 由来の芳香環ジオキシゲナーゼ (modified BphA1-BphA2-BphA3-BphA4) であることができる。

【0026】(1) Pseudomonas pseudoalcaligenes 由来の芳香環ジオキシゲナーゼおよびその改変体芳香環ジオキシゲナーゼは、Pseudomonas pseudoalcaligenes 由来のピフェニルジオキシゲナーゼ、特にPseudomonas pseudoalcaligenes KF707 株由来のピフェニルジオキシゲナーゼ (BphA1-BphA2-BphA3-BphA4) (A. Suyama, R. Iwakiri, N. Kimura, A. Nishi, K. Nakamura, K. Furukawa, J. Bacteriol., 178, 4039-4046, 1996) であることができる。

【0027】Pseudomonas pseudoalcaligenes KF707 由来のピフェニルジオキシゲナーゼの α サブユニット、 β サブユニット、フェレドキシン、およびフェレドキシンレダクターゼのアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号2、4、6、および8に記載のアミノ酸配列であることができる。

【0028】本発明において、配列番号2、4、6、および8に記載のアミノ酸配列は、それぞれ置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される1以上の改変 (例えば、1~数個の改変) を有していてもよい。この場合、改変されていてもよい配列番号2のアミノ酸配列からなる α サブユニット、改変されていてもよい配列番号4のアミノ酸配列からなる β サブユニット、改変されていてもよい配列番号6のアミノ酸配列からなるフェレドキシン、および改変されていてもよい配列番号8のアミノ酸配列からなるフェレドキシンレダクターゼからなる4量体は芳香環ジオキシゲナーゼ活性を有する。

【0029】本発明においては、 α サブユニットが、配列番号2のアミノ酸配列または配列番号2のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、の相同性を有するアミノ酸配列からなり、 β サブユニットが、配列番号4のアミノ酸配列または配列番号4のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、の相同性を有するアミノ酸配列からなり、フェレドキシンが、配列番号6のアミノ酸配列または配列番号6のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは9

5%以上、の相同性を有するアミノ酸配列からなり、フェレドキシンレダクターゼが、配列番号8のアミノ酸配列または配列番号8のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつαサブユニット、βサブユニット、フェレドキシン、およびフェレドキシンレダクターゼからなる4量体が芳香環ジオキシゲナーゼ活性を有することを特徴とする芳香環ジオキシゲナーゼを、複素環化合物および芳香族カルボン酸の水酸化に用いることができる。

【0030】本明細書において「芳香環ジオキシゲナーゼ活性を有する」とは、被験タンパク質と基質とを反応させて、基質変換反応の有無を検出することにより評価することができる。例えば実施例4および5に記載の方法に従って「芳香環ジオキシゲナーゼ活性を有する」か否かを評価することができる。

【0031】(2) 改変芳香環ジオキシゲナーゼ (modified BphA1-BphA2-BphA3-BphA4)

本発明による芳香環ジオキシゲナーゼは、*Burkholderia cepacia* LB400 株由来のビフェニルジオキシゲナーゼのαサブユニットに従ってαサブユニットが最適化された*Pseudomonas pseudoalcaligenes*由来のビフェニルジオキシゲナーゼ、特に*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 株由来のビフェニルジオキシゲナーゼ(modified BphA1-BphA2-BphA3-BphA4)であることができる。

【0032】従って*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 由来のビフェニルジオキシゲナーゼのαサブユニットは、置換、欠失、挿入、および付加からなる群から選択される1以上の改変を有する配列番号2のアミノ酸配列からなり、かつ*Burkholderia cepacia* LB400 株由来のビフェニルジオキシゲナーゼのαサブユニットのアミノ酸配列に従って改変がなされた配列であることができる。*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 由来のビフェニルジオキシゲナーゼのβサブユニット、フェレドキシン、およびフェレドキシンレダクターゼのアミノ酸配列は、それぞれ、改変されていてもよい配列番号4、6、および8に記載のアミノ酸配列であることができる。この場合、*Burkholderia cepacia* LB400 株由来のαサブユニットのアミノ酸配列に従って改変された配列番号2のアミノ酸配列からなるαサブユニット、改変されていてもよい配列番号4のアミノ酸配列からなるβサブユニット、改変されていてもよい配列番号6のアミノ酸配列からなるフェレドキシン、および改変されていてもよい配列番号8のアミノ酸配列からなるフェレドキシンレダクターゼからなる4つのサブユニットは芳香環ジオキシゲナーゼ活性を有する。

【0033】*Burkholderia cepacia* LB400 株由来のαサブユニットのアミノ酸配列は配列番号11に記載のアミノ酸配列であることができる。*Burkholderia cepacia* LB400 株由来のビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子、

すなわちbphAEFG 遺伝子のヌクレオチド配列は GenBank accession M86348に登録されている。

【0034】本発明において「*Burkholderia cepacia* L B400 株由来のビフェニルジオキシゲナーゼのαサブユニットのアミノ酸配列に従って改変がなされた」とは、*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 由来のαサブユニットのアミノ酸配列と*Burkholderia cepacia* LB400 株由来のαサブユニットのアミノ酸配列とを比較し、*Burkholderia cepacia* LB400 株由来のαサブユニットのアミノ酸残基と相違している*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 由来のαサブユニットの1または複数個のアミノ酸残基を、対応する*Burkholderia cepacia* LB400 株由来のαサブユニットのアミノ酸残基に置き換えることを意味する。対応する*Burkholderia cepacia* LB400 株由来のαサブユニットのアミノ酸残基が存在しない場合には、*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 由来のαサブユニットのアミノ酸残基を欠失させることができる。対応する*Burkholderia cepacia* LB400 株由来のαサブユニットのアミノ酸残基が存在するが、*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 由来のαサブユニットのアミノ酸残基が存在しないときには、対応する*Burkholderia cepacia* LB400 株由来のαサブユニットのアミノ酸残基を挿入することができる。

【0035】*Burkholderia cepacia* LB400 株由来のαサブユニットのアミノ酸配列に従って改変された配列番号2のアミノ酸配列としては、配列番号10のアミノ酸配列が挙げられる。

【0036】芳香環ジオキシゲナーゼの最適化は例えば下記のようにして行うことができる。

【0037】*Burkholderia cepacia* LB400 株由来のビフェニルジオキシゲナーゼ 大サブユニットをコードするDNAと *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707株由来のビフェニルジオキシゲナーゼの大サブユニットをコードするDNAを、共通のフランキング配列からなるbphA1プライマーを用いたPCRにより単離する。次に、これらをDnaseIで分解し、10-50 bp DNA断片を回収、混合し、セルフプライミングPCR、bphA1 プライマーを加えたPCRを行い、ランダムにアミノ酸配列が入れ替わった(DNA シャフリング)種々のキメラbphA1 を得る(実施例1参照)。

【0038】得られたキメラbphA1をbphA2A3A4とともに発現ベクターに連結し、基質変換反応を測定する。芳香環ジオキシゲナーゼは基質に作用するとメタ開裂産物を生じ、一般に、メタ開裂産物は黄色を呈するので、434 nmでモニターすることが可能である。次に、形質転換体を用いて、種々の芳香族炭化水素の変換能(水酸基導入活性)を調べる。芳香族炭化水素の変換能を指標にして形質転換体を選択し、組み込まれている遺伝子を常法に従って解析することにより、最適化されたアミノ酸配列およびヌクレオチド配列を得ることができる。

【0039】最適化された遺伝子を持つ形質転換体のうち、組換え大腸菌pKF2072は非常に広い基質特異性を示すことがわかった。このプラスミドpKF2072に含まれる改変ビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子における大サブユニット遺伝子 (modified *bphA1*) の塩基配列およびコードされるアミノ酸配列は配列番号9および10に記載される通りである。この改変された α サブユニットを *BphA1* (2072)、遺伝子を*bphA1* (2072) と呼ぶ場合がある。*BphA1* (2072) は、親株*P. pseudoalcaligenes* KF707由来のビフェニルジオキシゲナーゼ大サブユニット (*BphA1* (KF707) と呼ぶ場合がある) と4アミノ酸異なっており、もう一方の親株*B. cepacia* LB400由来のビフェニルジオキシゲナーゼ大サブユニット (*BphA* (LB400) と呼ぶ場合がある) と15アミノ酸異なっていた。この3つの大サブユニットのアミノ酸配列の比較を図3に示す。

【0040】本発明による製造法の具体的な態様において、芳香環ジオキシゲナーゼ遺伝子を発現するように形質転換された微生物を培養することにより得られた培養物を複素環化合物または芳香族カルボン酸と反応させることにより、複素環化合物または芳香族カルボン酸を水酸化することを含んでなる、水酸化された複素環化合物または芳香族カルボン酸の製造法が提供される。この場合、形質転換体を培養して培地を得、次いで複素環化合物または芳香族カルボン酸を得られた培地と接触させてこれらの化合物を水酸化する態様のみならず、複素環化合物や芳香族カルボン酸を含む培地中で形質転換体を培養する態様をも含む。本発明による製造法ではまた、形質転換体から生産された酵素が機能している限りにおいて、反応時に形質転換体は生存していても、していなくともよい。

【0041】芳香環ジオキシゲナーゼ遺伝子は、芳香環ジオキシゲナーゼをコードするDNAであることができる。

【0042】芳香環ジオキシゲナーゼには、上述のように、(1) *Pseudomonas pseudoalcaligenes*由来の芳香環ジオキシゲナーゼおよび芳香環ジオキシゲナーゼ活性を依然として有するその改変体、および(2) *Burkholderia cepacia* LB400株由来のビフェニルジオキシゲナーゼに従って α サブユニットが改変された*Pseudomonas pseudoalcaligenes*由来の芳香環ジオキシゲナーゼ(modified *BphA1*-*BphA2*-*BphA3*-*BphA4*)が含まれる。芳香環ジオキシゲナーゼのアミノ酸配列が与えられれば、それをコードするヌクレオチド配列は容易に定まり、例えば、配列番号2、4、6、8、および10のアミノ酸配列およびこれらの改変配列をコードするヌクレオチド配列を選択することができる。従って、4つのサブユニットからなる芳香環ジオキシゲナーゼをコードするDNA配列とは、配列番号1、3、5、7、および9のDNA配列の一部または全部に加え、同一のアミノ酸をコードする

DNA配列であって縮重関係にあるコドンでDNA配列として有する配列をも意味するものとし、更にこれらに対応するRNA配列も含まれる。

【0043】本発明においては、 α サブユニットをコードするDNA配列が、配列番号1のDNA配列または配列番号1のDNA配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、の相同性を有するDNA配列であり、 β サブユニットをコードするDNA配列が、配列番号3のDNA配列または配列番号3のDNA配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、の相同性を有するDNA配列であり、フェレドキシンをコードするDNA配列が、配列番号5のDNA配列または配列番号5のDNA配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、の相同性を有するDNA配列であり、フェレドキシンレダクターゼをコードするDNA配列が、配列番号7のDNA配列または配列番号7のDNA配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、の相同性を有するDNA配列であり、これらのDNA配列によりコードされた α サブユニット、 β サブユニット、フェレドキシン、およびフェレドキシンレダクターゼからなる4量体が芳香環ジオキシゲナーゼ活性を有することを特徴とする芳香環ジオキシゲナーゼ遺伝子を、複素環化合物および芳香族カルボン酸の水酸化に用いることができる。

【0044】*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707由来の芳香環ジオキシゲナーゼの α サブユニット、 β サブユニット、フェレドキシン、およびフェレドキシンレダクターゼをコードするDNA配列は、それぞれ、配列番号1、3、5、および7であることができる。*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707由来の芳香環ジオキシゲナーゼ遺伝子、すなわち、*bphA1A2A3A4* 遺伝子の塩基配列は GenBank accession M83673に登録されている。

【0045】*Burkholderia cepacia* LB400株由来の α サブユニットのアミノ酸配列に従って改変された配列番号2のアミノ酸配列をコードするDNA配列としては、配列番号9のヌクレオチド配列が挙げられる。

【0046】遺伝子の導入および遺伝子の発現 芳香環ジオキシゲナーゼ遺伝子を発現するよう形質転換された微生物は、芳香環ジオキシゲナーゼ遺伝子が連結された発現ベクターにより形質転換された微生物であることができる。

【0047】本発明による発現ベクターの構築の手順および方法並びに発現ベクターの宿主への導入および発現は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。プラスミドの作製並びにプラスミドの導入および発現は、例えば、"Vectors for cloning genes", Methods in Enzymology, 216, p. 469-631, 1992, Academic Press, および、"Other bacterial systems", Methods in Enzymology, 204, p. 305-636, 1991, Academic

Press、および、石田功、安東民衛 編、遺伝子発現実験マニュアル、1994、講談社を参照できる。形質転換体の選択および培養条件は、例えば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., "Molecular cloning -A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989、または、財団法人 発酵研究所, LIST OF CULTURES 10th Edition, 1996を参照できる。

【0048】本発明による発現ベクターは、例えば、芳香環ジオキシゲナーゼ遺伝子の上流にプロモーターを、また下流にターミネーターをそれぞれ作動可能に連結し、場合によっては遺伝子マーカーおよび/または他の制御配列を作動可能に連結することにより作製できる。本発明による遺伝子へのプロモーターおよびターミネーターの連結、および発現ユニットのベクターへの挿入は、慣用方法に従って行うことができる。

【0049】芳香環ジオキシゲナーゼ遺伝子を発現するよう形質転換された微生物は、芳香環ジオキシゲナーゼ遺伝子をそのまま直接導入した微生物であってもよい。遺伝子の宿主への直接導入は慣用方法に従って行うことができる。

【0050】本発明において用いることができる代表的な微生物への外来遺伝子の導入およびその発現を概要すると下記の通りである。

【0051】(1) 大腸菌

大腸菌への外来遺伝子の導入法は、ハナハンの方法、ルビジウム法などすでに確立されたいくつかの効率的方法があり、それを用いて行えばよい(例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, "Molecular cloning -A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 参照)。大腸菌での外来遺伝子の発現は常法に従って行えばよいが(例えば、"Molecular cloning -A laboratory manual.", および、遺伝子発現実験マニュアル、講談社 参照)、pUC系やpBluescript系等の lac のプロモーター、または pT7-7等のT7のプロモーターを有する大腸菌用ベクターを用いて発現させてもよい。

【0052】(2) 放線菌

Streptomyces lividans 等 いくつかの放線菌は、すでに宿主・ベクター系が確立されている。例えば、発現ベクター pIJ6021 は、薬剤耐性マーカー遺伝子として カナマイシン (Km) 耐性遺伝子を有しており、チオストレプトン (thiostrepton) で誘導をかけることができる (E. Takano, J. White, C. J. Thompson, M. J. Bibb, Gene, 166, 133-137, 1995 参照)。

【0053】(3) 酵母

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* への外来遺伝子の導入法は、リチウム法などすでに確立された方法があり、それを用いて行えばよい(例えば、秋山裕一監修バイオインダストリー協会編集、「酵母のニューバイオテクノロジー」医学出版センター 刊参照)。酵母での外来遺伝

子の発現は、PGK や GPD 等のプロモーターおよびターミネーターを用いて、外来遺伝子をこのプロモーターとターミネーターの間に転写のリードスルーを受けるように挿入した発現カセットを構築し、この発現カセットを、*S. cerevisiae* のベクター、例えば、YRp系(酵母染色体のARS配列を複製起点とする酵母用マルチコピーベクター)、YEp系(酵母の2 μ m DNAの複製起点を持つ酵母用マルチコピーベクター)、YIp系(酵母の複製起点を持たない酵母染色体組込み用ベクター)等のベクターに挿入することにより行うことができる(「酵母のニューバイオテクノロジー」医学出版センター刊、日本農芸化学会ABCシリーズ「物質生産のための遺伝子工学」朝倉書店刊、および、Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., Misawa, N., "Metabolic engineering for production of β -carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*". Biosci. Biotech. Biochem., 58, 1112-1114, 1994 参照)。

【0054】酵母 *Candida utilis* への外来遺伝子の導入法は、特開平8-173170号公報に従って実施できる。具体的にはシクロヘキシミド耐性遺伝子、G418耐性遺伝子、あるいはハイグロマイシン耐性遺伝子などの薬剤耐性マーカー遺伝子を含んだプラスミドを直鎖状にした後、電気パルス法もしくはリチウム法によって、染色体上に組み込むことができる。外来遺伝子の発現には特開平8-173170号公報に記載されたGAP、PGKなどのプロモーターを使用することができる。

【0055】形質転換体の培養と基質の変換反応

形質転換された微生物の培養には通常の培養方法を用いることができる。この際、外来遺伝子である芳香環ジオキシゲナーゼ遺伝子を運ぶベクターが脱落しないように、抗生物質添加などの適切な選択圧をかけることができる。培地としてはペプトン類、酵母エキス、糖類および無機物が使用できる。培養法としては、液体培養法が最も適している。培養温度は16~40℃、特に20~30℃が適当であり、培養中の培地のpHは4~10、特にpH6~8に維持することが望ましい。さらに、芳香環ジオキシゲナーゼを菌体内で多量につくらせるために遺伝子を誘導することが好ましい。例えば、組換え大腸菌の場合は、菌体をOD600 nmが1位まで増殖させた後にIPTGで誘導することができる。さらに、基質を添加した後、通常半日~4日間、共存培養を行うと、変換産物が培地中または菌体中に生成蓄積される。変換の程度は、HPLC分析により明らかにすることができる。

【0056】生成産物のHPLC分析には種々の方法が適用可能だと思われるが、種々の複素環化合物とその産物を1つのカラムで効率的に分離させるには、C18カラムを用いてグラジエントをかけて行うのが好ましい。また、ピークの紫外吸収スペクトルの解析を効率的に行うために、フォトダイオードアレイ検出器を用いるのが好ましい。

宿主として大腸菌を使用した場合の培養と変換反応は、例えば、下記のようにして実施できる。

【0057】一般に、大腸菌を始めとする多くの微生物は、15～50%のグリセロールに懸濁し、-70～-80℃のディープフリーザーに入れることで半永久的に保存できる（グリセロール保存）。従って形質転換体の保存に際しては、形質転換体をグリセロール保存株とすることができる。

【0058】生成物の精製と同定

生成物の精製は、一般的な有機低分子化合物の精製に用いられる合目的な任意の方法を用いることができる。

【0059】生成物は抽出の原理に基づいて精製することができる。培養濾液中の生成物についてはこれを水不混和性の有機溶媒、例えば酢酸エチルなどで抽出する方法、あるいは菌体内の生成物についてはろ過、遠心分離などで得た菌体をメタノール、エタノール、アセトンなどで回収する方法などが挙げられる。菌体を分離せずに培養物そのままを上記の抽出操作に付すこともできる。適当な溶媒を用いた向流分配法も抽出の範疇にいれることができる。

【0060】生成物はまた吸着の原理に基づいて精製することができる。既に液状となっている生成物含有物、例えば培養濾液あるいは上記のようにして抽出操作を行うことにより得られる抽出液を、適当な吸着剤、例えばシリカゲル、活性炭、「ダイヤイオンHP-20」（三菱化成社製）で処理して目的の生成物を吸着させ、その後適当な溶媒にて溶離させることによって生成物を得ることができる。このようにして得られた生成物溶液を減圧濃縮乾固すれば、生成物粗標品を得ることができる。

【0061】このようにして得られた生成物粗標品を更に精製するためには、上記の抽出法および吸着法にゲル濾過法、高速液体クロマトグラフィーなどを必要に応じて組み合わせて必要回数行えばよい。例えばシリカゲルなどの吸着剤、「セファデックスLH-20」（ファルマシア社製）などのゲル濾過剤を用いたカラムクロマトグラフィー、「YMCバック」（山村科学社製）などを用いた高速液体クロマトグラフィーおよび向流分配法を適宜組み合わせ実施することができる。

【0062】生成物の同定は、¹H-NMRおよび¹³C-NMRスペクトル分析、およびMSスペクトル分析等により行うことができる。

【0063】複素環化合物および水酸化された複素環化合物

本明細書において「複素環化合物」とは分子内に複素環式基を有する化合物を意味する。

【0064】本明細書において「複素環式基」とは窒素原子、酸素原子、および硫黄原子からなる群から選択される1以上の異種原子を含んでなる単環式または二環式の環状基であって、置換基により置換されていてもよいものを、意味する。

【0065】「複素環式基」の例としては、C₁₋₄ アルキル基により置換されていてもよい5～7員の飽和または不飽和の単環性複素環式基、およびC₁₋₄ アルキル基により置換されていてもよい9～11員の飽和または不飽和の二環性複素環式基が挙げられる。

【0066】「複素環式基」を構成する複素環の具体的な例としては、キノリン、インドール、インダノン、ベンゾチアゾール、ベンゾキサゾール、ピリジン、3-メチルピリジン、ピリミジン、ピロール、ピラゾール、3-メチルピラゾール、イミダゾール、イソチアゾール、ベンゾフラン、チオフェン、クロモン（4H-クロメン-4-オン）、クロマン-4-オン、6-ヒドロキシクロマン-4-オン、およびフタルイミドが挙げられる。

【0067】複素環化合物中の複素環式基がベンゾキサゾールであるとき、水酸化された複素環化合物は中の複素環式基は*cis*-4, 5-ジヒドロベンゾキサゾールジオールであることができる。

【0068】複素環化合物中の複素環式基がインドールであるとき、水酸化された複素環化合物中の複素環式基は5-ヒドロキシインドールであることができる。

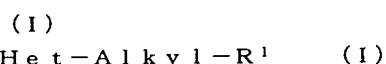
【0069】複素環化合物中の複素環式基がピラゾールであるとき、水酸化された複素環化合物中の複素環式基は4-ヒドロキシピラゾールであることができる。

【0070】複素環化合物中の複素環式基がピリジンであるとき、水酸化された複素環化合物中の複素環式基は3-ヒドロキシピリジンであることができる。

【0071】複素環化合物中の複素環式基がベンゾフランであるとき、水酸化された複素環化合物中の複素環式基は5-ヒドロキシベンゾフランまたは6-ヒドロキシベンゾフランであることができる。

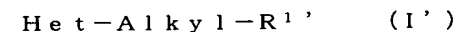
【0072】複素環化合物中の複素環式基がチオフェンであるとき、水酸化された複素環化合物は中の複素環式基は2, 3-ジヒドロキシー-2, 3-ジヒドロチオフェンであることができる。

【0073】複素環化合物は、複素環式基の他に非置換のフェニル基を有していてもよく、具体的には、式



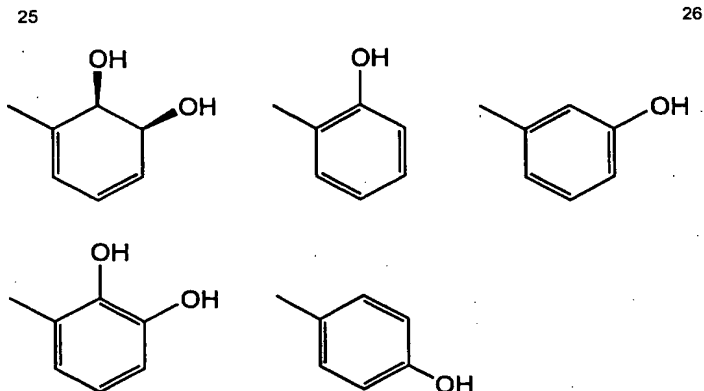
（式中、Hetは複素環式基を表し、Alkylは結合または炭素数1～4の分岐していてもよいアルキレン鎖を表し、R¹は非置換フェニル基を表す）を表すことができる。

【0074】複素環化合物が式(I)である場合、水酸化された複素環化合物は、式(I')



（式中、HetおよびAlkylは式(I)で定義した内容と同義であり、R^{1'}は下記基：

【化2】



のいずれかを表す)を表すことができる。

【0075】式(I)および式(I')においてAlkylは好ましくは $-(CH_2)_n-$ (nは0~4の整数を表す)を表す。

【0076】Alkylが結合を表すとき、すなわちnが0であるとき、複素環化合物は、複素環フェニル、すなわち複素環基とフェニル基とが単結合してなる化合物である。基質が「複素環フェニル」である場合、反応産物として複素環基-cis-2, 3-ジヒドロベンゼンジオール(複素環基-cis-2, 3-ジヒドロキシシクロヘキサ-4, 6-ジエン、フェニル基の2位と3位がcis-ジオールになったもの)を立体特異的反応により得ることができる。基質が「複素環フェニル」である場合、フェニル基の2位に1つの水酸基を導入することもできる。この場合の基質としては2-フェニルインドール、3-メチル-1-フェニルピラゾールが挙げられる。

【0077】Alkylがメチレンであるとき、すなわちnが1であるとき、複素環化合物は、複素環ベンジル、すなわち複素環基とフェニル基がメチレンを介して結合してなる化合物である。基質が「複素環ベンジル」である場合、反応産物として複素環基-メチレン-cis-2, 3-ジヒドロベンゼンジオール(複素環基-メチレン-cis-2, 3-ジヒドロキシシクロヘキサ-4, 6-ジエン、フェニル基の2位と3位がcis-ジオールになったもの)を立体特異的反応により得ることができる。基質が「複素環ベンジル」である場合、フェニル基の2位に1つの水酸基を導入することもできる。この場合の基質としては4-ベンジルイソチアゾールが挙げられる。

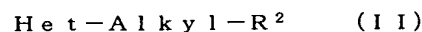
【0078】式(I)においてHetがインドールであるとき、水酸化された複素環化合物は式(I)の化合物であってHetが5-ヒドロキシインドールであるものを表すことができる。

【0079】式(I)においてHetがピラゾールであるとき、水酸化された複素環化合物は式(I)の化合物であって、Hetが4-ヒドロキシピラゾールであるものを表すことができる。

【0080】医薬品や化成品の製造においてcis-ジ

オール体をビルディングブロックとする有機合成反応が知られている(例えば、T. Hudlicky, A. J. Thorpe, Chem. Commun., 1993-2000, 1996, D. R. Boyd, G. N. Sheldrake, Natural Product Report, 309-324, 1998, またはT. Hudlicky, D. Gonzalez, D. T. Gibson, Aldrichimia Acta, Vol. 32, Number 2, 35-62, 1999 参照)。従って、得られたcis-ジオール体は、医薬品や他の化成品に繋げるための化学合成法のビルディングブロックの製造法として有用である。

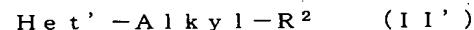
【0081】複素環化合物はまた、複素環式基の他に置換されたフェニル基を有していてもよく、具体的には、式(II)



(式中、Hetは複素環式基を表し、Alkylは結合または炭素数1~4の分岐していてもよいアルキレン鎖を表し、R²はC₁₋₄アルキル基または水酸基により置換されたフェニル基を表す)を表すことができる。

【0082】式(II)においてHetはベンゾキサゾールまたはピリジンを表し、R²は2-ヒドロキシフェニルまたは4-メチルフェニルを表すことができる。

【0083】複素環化合物が式(II)である場合、水酸化された複素環化合物は、式(II')



(式中、R²およびAlkylは式(II)で定義した内容と同義であり、Het'は1または2の水酸基により置換された複素環式基を表す)を表すことができる。式(II')の化合物は、水酸基が複素環式基に導入されていることを特徴とする。

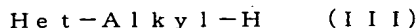
【0084】式(II)および式(II')においてAlkylは好ましくは $-(CH_2)_p-$ (pは0~4の整数を表す)を表す。

【0085】式(II)においてHetがベンゾキサゾールを表し、R²が2-ヒドロキシフェニルを表す場合、式(II')においてHet'は4, 5-ジヒドロキシ-4, 5-ジヒドロベンゾキサゾールであることができる。

【0086】式(II)においてHetがピリジンを表し、R²が4-メチルフェニルを表す場合、式(II')においてHet'は3-ヒドロキシピリジンであ

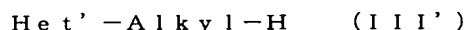
ることができる。

【0087】複素環化合物は更にまた、複素環式基の他に炭化水素鎖を有していてもよく、具体的には、複素環化合物は、式 (III)



(式中、Hetは複素環式基を表し、Alkylは炭素数1~8の分岐していてもよいアルキレン鎖を表す)を表すことができる。Hetはベンゾフランまたはチオフェンを表すことができる。

【0088】複素環化合物が式 (III) である場合、
10 水酸化された複素環化合物は、式 (III')



(式中、Het'は1または2の水酸基により置換された複素環式基を表し、Alkylは式 (III) で定義された内容と同義である)を表すことができる。式 (III')

複素環化合物

2-フェニルキノリン

2-フェニルインドール

2-フェニルインドール

2-フェニルインドール

3-フェニル-1-インダノン

2-フェニルベンゾチアゾール

2-フェニルベンゾキサゾール

2-フェニルピリジン

3-メチル-2-フェニルピリジン

4-フェニルピリミジン

1-フェニルピロール

1-フェニルピラゾール

3-メチル-1-フェニルピラゾール

3-メチル-1-フェニルピラゾール

2-ベンジルピリジン

いることを特徴とする。

【0089】式 (III) および式 (III') において Alkyl は好ましくは $-(\text{CH}_2)_r-$ (r は 1~8 の整数を表す) を表す。

【0090】式 (III) において Het がベンゾフランを表す場合、式 (III') において Het' は 3-ヒドロキシベンゾフランまたは 4-ヒドロキシベンゾフランであることができる。

【0091】式 (III) において Het がチオフェンを表す場合、式 (III') において Het' は 2, 3-ジヒドロキシ-2, 3-ジヒドロチオフェンであることができる。

【0092】本発明による製造法において、複素環化合物 (基質) および水酸化された複素環化合物 (反応産物) は、好ましくは、下記組み合わせから選択できる。

【0093】

水酸化された複素環化合物

3-(2-キノリル)-3, 5-

シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール

3-(1H-2-インドリル)-3, 5-

-シクロヘキサジエン-1, 2-

ジオール

2-(1H-2-インドリル)フェノール

2-フェニル-1H-5-インドロール

3-(5, 6-ジヒドロキシ-1, 3-

シクロヘキサジエンル)-1-

インダノン

3-(1, 3-ベンゾチアゾール-2-

イル)-3, 5-シクロヘキサジエン-

1, 2-ジオール

3-(1, 3-ベンゾオキサゾール-

2-イル)-3, 5-シクロヘキサジ-

エン-1, 2-ジオール

3-(2-ピリジル)-3, 5-

シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール

3-(3-メチルピリド-2-イル)

-3, 5-シクロヘキサジエン

-1, 2-ジオール

3-(4-ピリミジニル)-3, 5-

シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール

3-(1H-1-ピロリル)-3, 5-

シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール

4-ヒドロキシ-1-フェニルピラ

ゾール

3-(3-メチルピラゾール-1-

イル)-3, 5-シクロヘキサジエン

-1, 2-ジオール

2-(3-メチルピラゾール-1-

イル)フェノール

3-(2-ピリジルメチル)-3, 5-

1-ベンジルイミダゾール
 4-ベンジルイソチアゾール
 4-ベンジルイソチアゾール
 2-(2-ヒドロキシフェニル)
 ベンゾキサゾール
 2-(p-トリル)ピリジン
 2-n-ブチルベンゾフラン
 2-n-ブチルベンゾフラン
 3-n-ヘキシルチオフェン

上記複素環化合物の化学構造は図4および図5に示される通りである。上記水酸化された複素環化合物の絶対立体配置は図6および図7に示される通りである。

【0094】本発明において用いることができる複素環化合物としては更に、フラボノイド、例えば、フラボン、フラバノン、または6-ヒドロキシフラバノンが挙げられる。フラボノイドおよび水酸化されたフラボノイドは、それぞれ式(I)および式(I')で表すことができる。この場合式(I)および式(I')において、Hetは、クロモン(4H-クロメン-4-オン)または

フラボノイド
 フラボン
 フラボン
 フラバノン
 フラバノン
 フラバノン
 6-ヒドロキシフラバノン
 6-ヒドロキシフラバノン

上記フラボノイドの化学構造は図8に示される通りである。上記水酸化されたフラボノイドの化学構造は図9に示される通りである。

【0098】本発明において用いることができる複素環化合物としては更に、芳香環を有するフタルイミド誘導体、例えば、2-(1-フェニルエチル)-1,3-イソインドールイネジオンおよび2-(1,2,3,4-テトラヒドロ-1-ナフタレニル)-1,3-イソインドールイネジオンが挙げられる。芳香環を有するフタルイミド誘導体および水酸化された芳香環を有するフタ

シクロヘキサジエン-1,2-ジオール
 3-(1H-1-イミダゾリルメチル)
 -3,5-シクロヘキサジエン-1,2-ジオール
 3-(4-イソチアゾリルメチル)
 -3,5-シクロヘキサジエン-1,2-ジオール
 2-(4-イソチアゾリルメチル)
 フェノール
 2-(2-ヒドロキシフェニル)
 -4,5-ジヒドロ-1,3-ベンゾオキサゾール-4,5-ジオール
 2-(4-メチルフェニル)-3-ピリジオール
 2-ブチルベンゾ[b]フラン-6-オール
 2-ブチルベンゾ[b]フラン-5-オール
 4-ヘキシル-2,3-ジヒドロ-2,3-チオフェンジオール

【0095】水酸化されたフラボノイドとしては、フラボノイドの2',3'-ジヒドロキシ体、2'-ヒドロキシ体、および3'-ヒドロキシ体、例えば、2',3'-ジヒドロキシフラボン、3'-ヒドロキシフラボン、2',3'-ジヒドロキシフラバノン、2',-ヒドロキシフラバノン、3'-ヒドロキシフラバノン、2',6-ジヒドロキシフラバノン、および3',6-ジヒドロキシフラバノンが挙げられる。

【0096】本発明による製造法において、フラボノイド(基質)および水酸化されたフラボノイド(反応産物)は、好ましくは、下記組み合わせから選択できる。

【0097】

水酸化されたフラボノイド
 2',3'-ジヒドロキシフラボン
 3'-ヒドロキシフラボン
 2',3'-ジヒドロキシフラバノン
 2'-ヒドロキシフラバノン
 3'-ヒドロキシフラバノン
 2',6-ジヒドロキシフラバノン
 3',6-ジヒドロキシフラバノン

ルイミド誘導体は、それぞれ式(I)および式(I')で表すことができる。この場合式(I)および式(I')において、Hetはフタルイミドであることができる。

【0099】水酸化された芳香環を有するフタルイミド誘導体としては、その芳香環内またはベンジル位がヒドロキシ化されたヒドロキシ体、例えば、2-[1-(4-ヒドロキシフェニル)エチル]-1,3-イソインドールイネジオンおよび2-(4-ヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロ-1-ナフタレニル)-1,3-

ーイソインドールイネジオンが挙げられる。

【0100】本発明による製造法において、芳香環を有するフタルイミド誘導体（基質）および水酸化された芳香環を有するフタルイミド

誘導体

2-（1-フェニルエチル）-1, 3-イソインドールイネジオン

2-（1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-1-ナフタレン）-1, 3-イソインドールイネジオン

上記芳香環フタルイミド誘導体の化学構造は図8に示される通りである。上記水酸化された芳香環フタルイミド誘導体の化学構造は図9に示される通りである。

【0102】芳香族カルボン酸および水酸化された芳香族カルボン酸

本明細書において「芳香族カルボン酸」とは分子内にカルボキシル基を有する芳香族化合物を意味する。

【0103】本明細書において「芳香族化合物」の具体的な例としては、ベンゼン、ナフタレンが挙げられる。

【0104】芳香族カルボン酸はより具体的には、式（IV）

$R^3 - \text{Alkyl} - \text{COOR}^4$ (IV)

（式中、 R^3 は非置換炭素環式基を表し、 Alkyl は結合または炭素数1～4の分岐していてもよいアルキレン鎖を表し、 R^4 は水素原子またはカルボキシル基の保護基を表す）、で表すことができる。

【0105】 R^3 は好ましくは不飽和の5～7員単環性炭素環式基または不飽和の9～11員二環性炭素環式基、より好ましくはフェニルおよびナフチルを表す。

芳香族カルボン酸

1-ナフトイック酸

1-ナフチル酢酸

1-ナフチル酢酸

上記芳香族カルボン酸の化学構造は図8に示される通りである。上記水酸化された芳香族カルボン酸の化学構造は図9に示される通りである。

【0111】Burkholderia cepacia LB400 株由来の芳香環ジオキシゲナーゼに従って α サブユニットが改変されたPseudomonas pseudoalcaligenes由来のビフェニルジオキシゲナーゼ(modified BphA1-BphA2-BphA3-BphA4)は上記の複素環化合物をすべて水酸化できる。

【0112】P. pseudoalcaligenes KF707 由来の芳香環ジオキシゲナーゼ (BphA1A2A3A4) を発現させて得られた培地も、種々の複素環化合物を変換できる。P. pseudoalcaligenes KF707 由来の芳香環ジオキシゲナーゼを用いる場合、基質としては、上記複素環化合物のうち2-フェニルピリジン、3-メチル-2-フェニルピリジン、4-フェニルピリジン、および1-フェニルピラ

香環を有するフタルイミド誘導体（反応産物）は、好ましくは、下記組み合わせから選択できる。

【0101】

水酸化された芳香環を有するフタルイミド誘導体

2-[1-(4-ヒドロキシフェニル)エチル]-1, 3-イソインドールイネジオン

2-(4-ヒドロキシ-1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-1-ナフタレン)-1, 3-イソインドールイネジオン

【0106】水酸化された芳香族カルボン酸は、式（IV'）

$R^3' - \text{Alkyl} - \text{COOR}^4$ (IV')

（式中、 Alkyl および R^4 は前記で定義した内容と同義であり、 R^3' は1または2の水酸基により置換された炭素環式基を表す）で表すことができる。

【0107】 R^3' は好ましくは1または2の水酸基により置換された不飽和の5～7員単環性炭素環式基または不飽和の9～11員二環性炭素環式基、より好ましくは1または2の水酸基により置換されたフェニルおよびナフチルを表す。

【0108】式（IV）および式（IV'）において Alkyl は、好ましくは、結合、メチレン、または $-(\text{CH})-(\text{CH}_3)-$ を表す。

【0109】本発明による製造法において、芳香族カルボン酸（基質）および水酸化された芳香族カルボン酸（反応産物）は、好ましくは、下記組み合わせから選択できる。

【0110】

水酸化された芳香族カルボン酸

4-ヒドロキシ-1-ナフトイック酸

4-ヒドロキシ-1-ナフチル酢酸

5-ヒドロキシ-1-ナフチル酢酸

ゾール以外の複素環化合物が好ましい。

【0113】本発明によれば複素環化合物に水酸基を導入する方法が提供される。この方法は芳香環ジオキシゲナーゼを複素環化合物と反応させることを含んでなるもの、である。芳香環ジオキシゲナーゼには、上述のように、（1）Pseudomonas pseudoalcaligenes 由来の芳香環ジオキシゲナーゼおよび芳香環ジオキシゲナーゼ活性を依然として有するその改変体、および（2）Burkholderia cepacia LB400株由来のビフェニルジオキシゲナーゼに従って α サブユニットが改変されたPseudomonas pseudoalcaligenes 由来の芳香環ジオキシゲナーゼ(modified BphA1-BphA2-BphA3-BphA4)が含まれる。

【0114】本発明によればまた、複素環化合物を水酸化するための組成物が提供される。この組成物は、芳香環ジオキシゲナーゼを含んでなるもの、である。芳香環

ジオキシゲナーゼには、上述のように、(1) *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 由来の芳香環ジオキシゲナーゼおよび芳香環ジオキシゲナーゼ活性を依然として有するその改変体、および(2) *Burkholderia cepacia* LB400 株由来のビフェニルジオキシゲナーゼに従って α サブユニットが改変された *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 由来の芳香環ジオキシゲナーゼ(modified BphA1-BphA2-BphA3-BphA4)が含まれる。本発明による組成物には、単離・精製された芳香環ジオキシゲナーゼを含むもののみならず、芳香環ジオキシゲナーゼを発現する微生物を培養することにより得られた液体培地も含まれる。

【0115】

【実施例】以下の実施例は、本発明をさらに具体的に説明するためのものであり、本発明を限定するものではない。

【0116】ここで用いられた通常の遺伝子組換え実験は、特に言及されていない場合は、標準的な方法(Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., "Molecular cloning -A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に基づいている。

【0117】**実施例1：大腸菌発現用プラスミドの作製**
1-1. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 由来の biphenyl dioxygenase 遺伝子を含むプラスミド
Pseudomonas pseudoalcaligenes KF707 由来の biphenyl dioxygenase 遺伝子群(bphA1A2A3A4)を大腸菌ベクターpUC118のlacプロモーターの転写のリードスルーを受ける方向に挿入することにより、大腸菌における biphenyl dioxygenase 遺伝子発現用プラスミドであるpKF6

フォワード側：5' -CCGAATTCAAGGAGACGTTGAATCATGAGCTCAGC-3'

リバース側：5' -TTGAATTCTTCGGTTGACAGATCT-3'

フォワード側にはSacI部位が、リバース側にはBglII部位があり(イタリックで示されている)、両側にさらにEcoRI部位が付与されている(アンダーラインで示されている)。PCRの条件は、94℃ 1分、52℃ 1.5分、72℃ 1分で、25サイクルであった。

【0120】単離された上記の2種類のbphA1を混ぜ合わせ、0.15 ユニットのDnaseI(宝酒造)で15℃ 6分間、分解処理した。10-50 bp DNA断片をアガロースゲルから回収後、混合し、セルフプライミングPCR、bphA1プライマーを加えたPCRを行い、ランダムにアミノ酸配列が入れ替わった(DNA シャフリング)種々のキメラbphA1を含むPCR産物を得た。なお、PCRは上記と同じ条件で行い、種々のキメラbphA1を含むPCR産物は、SacI/BglIIで二重消化後、アガロースゲルから精製した。

【0121】*P. pseudoalcaligenes* KF707株のbphA1A2A3A4-bphB-bphC 遺伝子群を含む発現プラスミドpJHF18(Hirose, J., Suyama, A., Hayashida, S., Furukawa, K., Gene, 128, 27-33, 1994 参照)を有する大腸菌は、メタ開裂まで反応が進むので、ビフェニルを基質と

622 を作製した。より具体的には、bphA1A2A3A4-bphB-bphC 遺伝子群を含む6.78 kb XhoI 断片(A. Suyama, R. Iwakiri, N. Kimura, A. Nishi, K. Nakamura, K. Furukawa, J. Bacteriol., 178, 4039-4046, 1996、または、GenBank accession M83673 参照)をpUC118のXhoI 部位に挿入した。次に、bphBとbphC内にまたがって存在していた1.43 kb PpuMI断片を、PpuMI消化、re-ligationにより欠失させた。これにより、bphA1A2A3A4 遺伝子のみを含む5.35 kb断片がpUC118のlacプロモーターの転写のリードスルーを受ける方向に挿入されたプラスミドpKF6622を得た。このpKF6622を大腸菌JM109株に導入することにより得られた形質転換体(大腸菌(pKF6622) : FERM BP-7300)を以後の実験に用いた。

【0118】1-2. 改変biphenyl dioxygenase 遺伝子を含むプラスミド

Burkholderia cepacia LB400 株由来のビフェニルジオキシゲナーゼ 大サブユニットをコードするDNA (bphA1) (この塩基配列は GenBank accession M86348に登録されている)と *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707株由来のビフェニルジオキシゲナーゼの大サブユニットをコードするDNA (bphA1) (この塩基配列はGenBank accession M83673に登録されている)を、共通のフランキンギン配列からなるbphA1 プライマーを用いたPCRにより単離した。bphA1 プライマーの塩基配列を示す下記の通りである。

【0119】

【表1】

した場合は、メタ開裂産物として、2-hydroxy-6-oxo-6-p-henylhexa-2,4-dienoic acidを生成する。一般に、メタ開裂産物は黄色を呈するので、434 nm でモニターすることが可能である。プラスミドpJHF18において、1カ所のMluI部位がbphA1内にあるので、MluIで消化、filled-in後、re-ligationを行うことにより、bphA1 のみを破壊したプラスミドpJHF18Δ MluIを作製した(T. Kumaru, H. Suenaga, M. Mitsuoka, T. Watanabe, K. Furukawa, NatureBiotechnology, 16, 663-666, 1998 参照)。次に、pJHF18Δ MluIをSacI/BglIIで二重消化により、ΔbphA1 遺伝子のみを含む1.39 kb断片を除き、代わりに、上記で作製した種々のキメラbphA1を含むPCR産物(SacI/BglIIで二重消化後のもの)を挿入し、種々の改変ビフェニルジオキシゲナーゼ遺伝子(modified bphA1::bphA2A3A4 遺伝子)と bphBbphC 遺伝子を含む種々のプラスミド(pSHF1000シリーズ)を得た。これら種々のプラスミドを有する大腸菌 XL1-Blue にビフェニル蒸気を充て、メタ開裂により黄色を呈することができるコロニーを選抜し、以後の実験に用いた。メタ開裂によ

り黄色を呈することができるコロニーにおいては、DNA shufflingにより得られたmodified bphA1 遺伝子が正常に機能できることを意味している。

【0122】ビフェニール蒸気により黄色を呈することができた、いくつかの大腸菌形質転換体のうちの1つ(この大腸菌に含まれるプラスミドをpSHF1072と命名)は、ビフェニールに対するメタ開裂の分解効率が、それぞれの親(KF707およびLB400)のbphA1遺伝子を持つものより、2倍近く高かっただけでなく、それぞれの親(KF707およびLB400)のbphA1遺伝子を持つものが分解できないベンゼンやトルエンをもメタ開裂により分解することができた。ただし、この分解効率は、*P. putida*Flの相当遺伝子todC1 遺伝子を持つものの1/3位であった。

【0123】次に、プラスミドpSHF1072に含まれるshuffled bphA1::bphA2A3A4 遺伝子群が大腸菌ベクターpUC118のlacプロモーターの転写のリードスルーを受ける方向に挿入された、改変biphenyl dioxygenase遺伝子発現用プラスミドpKF2072を作製した。より具体的には、プラスミドpSHF1072からshuffled bphA1-bphA2A3A4-bphB-bphC 遺伝子群を含む6.78 kb *Xho*I 断片を切りだし、pUC118の*Xho*I部位に挿入した。次に、bphBとbphC内にまたがって存在していた1.43 kb *Pvu*MI断片を、*Pvu*MI消化、re-ligationにより欠失させた。これにより、shuffled bphA1 (pSHF1072由来)::bphA2A3A4 遺伝子のみを含む5.35 kb断片がpUC118のlacプロモーターの転写のリードスルーを受ける方向に挿入されたプラスミドpKF2072を得た。このpKF2072を大腸菌JM109株に導入することにより得られた形質転換体(大腸菌(pKF2072):FERMBP-7299)を以後の実験に用いた。

【0124】実施例2:大腸菌形質転換体と基質の共存培養

実施例1で作製した2種類のフェレドキシン性の芳香環ジオキシゲナーゼ遺伝子を有する組換え大腸菌、すなわち、大腸菌(pKF6622)および大腸菌(pKF2072)を、150 μg/mlのアンピシリン(Ap)を含むLB培地(1%トリプトン、0.5%酵母エキス、1% NaCl)で対数期前半まで液体培養し、最終濃度が約30%になるようにグリセロールに懸濁し、-70~-80℃のディープフリーザーに入れることにより、グリセロール保存株とした。また、コントロールとして、pUC118等のAp耐性のベクターのみを有する大腸菌(JM109株)も同様に培養してグリセロール保存株を作製した。

【0125】変換反応を開始するにあたって、まず、上記のグリセロール保存株から、必要な大腸菌形質転換体を白金耳で掻き取り、150 μg/mlのアンピシリン(Ap)を含むLB培地4 mlに懸濁し、175 rpm、28℃で7~8時間培養した(前培養)。次に、この前培養液を、150 μg/mlのAp、0.4% (w/v)のグルコース、および10 μg/mlのチアミン(thiamine)を含むM9培地(Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., "Molecular cloning -

A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Appendix A・3 参照) 70 mlに入れ、175 rpm、28℃で16~17時間(一晚)培養した(本培養)。これで、OD 600 nmが約1になる。これを8,000 rpm、5分間、遠心分離して菌体のみを集めた後、最終濃度1 mMのイソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド(IPTG)と5 mgの基質を含む70 mlのM9培地(150 μg/mlのAp、0.4% (w/v)のグルコース、および10 μg/mlのチアミンを含む)に懸濁し、175 rpm、28℃で2~3日間さらに培養を行った。なお、基質は、通常10 mg/mlの濃度になるようにエタノール等の溶媒に溶かしたものを0.5 ml加えた。培養2~3日目に70 mlのメタノールを加え30分間攪拌することにより脂質を抽出し、8,000 rpm、5分間、遠心分離して上清を集め、脂質粗抽出液とした。たいていの場合、この状態で4℃で数週間保存可能であったが、脂質抽出液はすぐにHPLC分析に供した。

【0126】実施例3:変換産物のHPLC分析

実施例3で調製された脂質粗抽出液80 μlを1回のinjectionに供した。Puresil C18カラム(4.6 mm x 250 mm, Waters)を用い、1 ml/minの速度でHPLCを行った。HPLCの本体装置としてWaters社のアライアンスシステムを用い、フォトダイオードアレイ検出器としてWaters 996型を用いた。展開溶媒の条件は、以下の通りである。

A液:水/メタノール(50/50)

B液:メタノール/2-プロパノール(60/40)

0~5分(A液)、5~20分(A液)→(B液)凸型グラジエント(No 3, Waters)、20分~(B液)

この条件では通常、33分以内に全化合物が分離された。230~350nmの範囲で吸収極大値を示した波長(max plot)でモニターしたピークの面積比を変換率とした。

【0127】この分析で変換が確認されたものについて次の精製・同定のステップに進めた。なお、精製・同定のステップに進める場合は、培養のスケールを実施例2のスケールの10倍で行った。

【0128】実施例4:各種基質を用いた変換実験

以下で用いた基質は、Sigma-Aldrich社や東京化成などから購入した。

4-1. 2-フェニルキノリンの変換実験

実施例2に示した方法により、2種類の組換え大腸菌(コントロールも含む)を用いて、2-フェニルキノリン(図4)の変換実験を行った。2-フェニルキノリンは、10 mg/mlの濃度でエタノールに溶かしたものを0.5 mlを70 mlの本培養培地に添加し共存培養した。HPLC分析の結果、大腸菌(pKF2072)および大腸菌(pKF6622)は2-フェニルキノリンを基質として利用し変換できることがわかった。変換率は、それぞれ、89%および53%であった。

【0129】4-2. 2-フェニルインドールの変換実験
実施例2に示した方法により、2種類の組換え大腸菌(コントロールも含む)を用いて、2-フェニルインドー

ル(図4)の変換実験を行った。2-フェニルインドールは、10 mg/mlの濃度でエタノールに溶かしたものを 0.5 mlを 70 mlの本培養培地に添加し共存培養した。HPLC分析の結果、大腸菌 (pKF2072) および大腸菌 (pKF6622) は2-フェニルインドールを基質として利用し変換できることがわかった。変換率は、それぞれ、71% および 23%であった。なお、前者において、変換産物のピークは 3本観察された。

【0130】4-3. 3-フェニル-1-インダノンの変換実験

実施例2に示した方法により、2種類の組換え大腸菌(コントロールも含む)を用いて、3-フェニル-1-インダノン(図4)の変換実験を行った。3-フェニル-1-インダノンは、10 mg/mlの濃度でエタノールに溶かしたものを 0.5 mlを 70 mlの本培養培地に添加し共存培養した。HPLC分析の結果、大腸菌 (pKF2072) および 大腸菌 (pKF6622)は3-フェニル-1-インダノンを基質として利用し変換できることがわかった。変換率は、それぞれ、97% および 93%であった。

【0131】4-4. 2-フェニルベンゾチアゾールの変換実験

実施例2に示した方法により、2種類の組換え大腸菌(コントロールも含む)を用いて、2-フェニルベンゾチアゾール(図4)の変換実験を行った。2-フェニルベンゾチアゾールは、10 mg/mlの濃度でエタノールに溶かしたものを 0.5 mlを 70 mlの本培養培地に添加し共存培養した。HPLC分析の結果、大腸菌 (pKF6622) および 大腸菌 (pKF2072) は2-フェニルベンゾチアゾールを基質として利用し変換できることがわかった。変換率は、それぞれ、81% および 36%であった。

【0132】4-5. 2-フェニルベンゾキサゾールの変換実験

実施例2に示した方法により、2種類の組換え大腸菌(コントロールも含む)を用いて、2-フェニルベンゾキサゾール(図4)の変換実験を行った。2-フェニルベンゾキサゾールは、10 mg/mlの濃度でエタノールに溶かしたものを 0.5 mlを 70 mlの本培養培地に添加し共存培養した。HPLC分析の結果、大腸菌 (pKF2072) および 大腸菌 (pKF6622) は2-フェニルベンゾキサゾールを基質として利用し変換できることがわかった。変換率は、それぞれ、100% および 45%であった。

【0133】4-6. 2-フェニルピリジンの変換実験
実施例2に示した方法により、2種類の組換え大腸菌(コントロールも含む)を用いて、2-フェニルピリジン(図4)の変換実験を行った。2-フェニルピリジンは、10 mg/mlの濃度で 70% エタノールに溶かしたものを 0.5 mlを 70 mlの本培養培地に添加し共存培養した。HPLC分析の結果、大腸菌 (pKF2072) のみが明確に2-フェニルピリジンを基質として利用し変換できることがわかった。変換率は 14%であった。大腸菌 (pKF6622) の

場合は、変換産物はほとんど観察されなかった。

【0134】4-7. 3-メチル-2-フェニルピリジンの変換実験

実施例2に示した方法により、2種類の組換え大腸菌(コントロールも含む)を用いて、3-メチル-2-フェニルピリジン(図4)の変換実験を行った。3-メチル-2-フェニルピリジンは、10 mg/mlの濃度で 70% エタノールに溶かしたものを 0.5 mlを 70 mlの本培養培地に添加し共存培養した。HPLC分析の結果、大腸菌 (pKF2072) のみが明確に3-メチル-2-フェニルピリジンを基質として利用し変換できることがわかった。変換率は 16%であった。大腸菌 (pKF6622) の場合は、変換産物はほとんど観察されなかった。

【0135】4-8. 4-フェニルピリミジンの変換実験
実施例2に示した方法により、2種類の組換え大腸菌(コントロールも含む)を用いて、4-フェニルピリミジン(図4)の変換実験を行った。4-フェニルピリミジンは、10 mg/mlの濃度で70% エタノールに溶かしたものを 0.5 mlを 70 mlの本培養培地に添加し共存培養した。HPLC分析の結果、大腸菌 (pKF2072) のみが明確に4-フェニルピリミジンを基質として利用し変換できることがわかった。変換率は 100%であった。大腸菌 (pKF6622) の場合は、変換産物はほとんど観察されなかった。

【0136】4-9. 1-フェニルピロールの変換実験
実施例2に示した方法により、2種類の組換え大腸菌(コントロールも含む)を用いて、1-フェニルピロール(図4)の変換実験を行った。1-フェニルピロールは、10 mg/mlの濃度でエタノールに溶かしたものを 0.5 mlを 70 mlの本培養培地に添加し共存培養した。HPLC分析の結果、大腸菌 (pKF2072) および 大腸菌 (pKF6622) は1-フェニルピロールを基質として利用し変換できることがわかった。変換率は、両者とも 100%であった。

【0137】4-10. 1-フェニルピラゾールの変換実験
実施例2に示した方法により、2種類の組換え大腸菌(コントロールも含む)を用いて、1-フェニルピラゾール(図4)の変換実験を行った。1-フェニルピラゾールは、10 mg/mlの濃度で 70% エタノールに溶かしたものを 0.5 mlを 70mlの本培養培地に添加し共存培養した。HPLC分析の結果、大腸菌 (pKF2072) の1株のみが明確に1-フェニルピラゾールを基質として利用し変換できることがわかった。変換率は 47%であった。大腸菌 (pKF6622) の場合は、変換産物はほとんど観察されなかった。

【0138】4-11. 3-メチル-1-フェニルピラゾールの変換実験

実施例2に示した方法により、2種類の組換え大腸菌(コントロールも含む)を用いて、3-メチル-1-フェニルピラゾール(図4)の変換実験を行った。3-メチル-1-フェニルピラゾールは、10 mg/mlの濃度でエタ

ノールに溶かしたものを 0.5 ml を 70 ml の本培養培地に添加し共存培養した。HPLC 分析の結果、大腸菌 (pKF2072) および 大腸菌 (pKF6622) は 3-メチル-1-フェニルピラゾールを基質として利用し変換できることがわかった。変換率は、それぞれ、100% および 63% であった。なお、前者において、変換産物のピークは 2 本観察された。

【0139】4-12. 2-ベンジルピリジンの変換実験
実施例 2 に示した方法により、2 種類の組換え大腸菌 (コントロールも含む) を用いて、2-ベンジルピリジン (図 5) の変換実験を行った。2-ベンジルピリジンは、10 mg/ml の濃度でエタノールに溶かしたものを 0.5 ml を 70 ml の本培養培地に添加し共存培養した。HPLC 分析の結果、大腸菌 (pKF2072) および 大腸菌 (pKF6622) は 2-ベンジルピリジンを基質として利用し変換できることがわかった。変換率は、それぞれ、57% および 11% であった。

【0140】4-13. 1-ベンジルイミダゾールの変換実験
実施例 2 に示した方法により、2 種類の組換え大腸菌 (コントロールも含む) を用いて、1-ベンジルイミダゾール (図 5) の変換実験を行った。1-ベンジルイミダゾールは、10 mg/ml の濃度でエタノールに溶かしたものを 0.5 ml を 70 ml の本培養培地に添加し共存培養した。HPLC 分析の結果、大腸菌 (pKF2072) および 大腸菌 (pKF6622) は 1-ベンジルイミダゾールを基質として利用し変換できることがわかった。変換率は、それぞれ、97% および 43% であった。

【0141】4-14. 4-ベンジルイソチアゾールの変換実験
実施例 2 に示した方法により、2 種類の組換え大腸菌 (コントロールも含む) を用いて、4-ベンジルイソチアゾール (図 5) の変換実験を行った。4-ベンジルイソチアゾールは、10 mg/ml の濃度でエタノールに溶かしたものを 0.5 ml を 70 ml の本培養培地に添加し共存培養した。HPLC 分析の結果、大腸菌 (pKF2072) および 大腸菌 (pKF6622) は 4-ベンジルイソチアゾールを基質として利用し変換できることがわかった。変換率は、それぞれ、65% および 27% であった。なお、大腸菌 (pKF2072) において、変換産物のピークは 2 本観察された。

【0142】4-15. 2-(2-ヒドロキシフェニル)ベンゾキサゾールの変換実験
実施例 2 に示した方法により、2 種類の組換え大腸菌 (コントロールも含む) を用いて、2-(2-ヒドロキシフェニル)ベンゾキサゾール (図 5) の変換実験を行った。2-(2-ヒドロキシフェニル)ベンゾキサゾールは、5 mg/ml の濃度でエタノールに溶かしたものを 1 ml を 70 ml の本培養培地に添加し共存培養した。HPLC 分析の結果、大腸菌 (pKF2072) および 大腸菌 (pKF6622) は 2-(2-ヒドロキシフェニル)ベンゾキサゾールを基

質として利用し変換できることがわかった。変換率は、それぞれ、39% および 25% であった。

【0143】4-16. 2-(p-トリル)ピリジンの変換実験
実施例 2 に示した方法により、2 種類の組換え大腸菌 (コントロールも含む) を用いて、2-(p-トリル)ピリジン (図 5) の変換実験を行った。2-(p-トリル)ピリジンは、10 mg/ml の濃度で 70% エタノールに溶かしたものを 0.5 ml を 70 ml の本培養培地に添加し共存培養した。HPLC 分析の結果、大腸菌 (pKF2072) および 大腸菌 (pKF6622) は 2-(p-トリル)ピリジンを基質として利用し変換できることがわかった。変換率は、それぞれ、96% および 61% であった。

【0144】4-17. 2-n-ブチルベンゾフランの変換実験

実施例 2 に示した方法により、2 種類の組換え大腸菌 (コントロールも含む) を用いて、2-n-ブチルベンゾフラン (図 5) の変換実験を行った。2-n-ブチルベンゾフランは、10 mg/ml の濃度でエタノールに溶かしたものを 0.5 ml を 70 ml の本培養培地に添加し共存培養した。HPLC 分析の結果、大腸菌 (pKF6622) および 大腸菌 (pKF2072) は 2-n-ブチルベンゾフランを基質として利用し変換できることがわかった。変換率は、それぞれ、100% および 90% であった。なお、大腸菌 (pKF2072) において、変換産物のピークは 2 本観察された。

【0145】4-18. 3-n-ヘキシルチオフェンの変換実験

実施例 2 に示した方法により、2 種類の組換え大腸菌 (コントロールも含む) を用いて、3-n-ヘキシルチオフェン (図 5) の変換実験を行った。3-n-ヘキシルチオフェンは、10 mg/ml の濃度でエタノールに溶かしたものを 0.5 ml を 70 ml の本培養培地に添加し共存培養した。HPLC 分析の結果、大腸菌 (pKF2072) および 大腸菌 (pKF6622) は 3-n-ヘキシルチオフェンを基質として利用し変換できることがわかった。変換率は、それぞれ、100% および 99% であった。

【0146】実施例 5：変換産物の精製・同定

5-1. 2-フェニルキノリンの変換産物 (図 6)

大腸菌 (pKF2072) と 2-フェニルキノリンの混合培養液 700 ml に等量のメタノールを添加し、室温で 2 時間攪拌した。これを 7,000 rpm, 10 min 遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下 300 ml まで濃縮し、等量の酢酸エチルで 2 度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを 55 mg を得た。エキスをシリカゲルカラム (Merck60, ϕ 2cm x 30cm) に供し、ヘキサン：酢酸エチル = 10 : 1 の溶媒で展開することにより、化合物 1 (3-(2-キノリル)-3,5-シクロヘキサジェン-1,2-ジオール) (12mg) を純粋な物質として単離した。

化合物 1 (3-(2-quinoly1)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol) の物性

EI-MS(m/z): 239(M⁺)

¹H-NMR: (500MHz, CDCl₃): 4.50(dd, J=3.0, 6.7, 1H), 5.08(d, J=6.7, 1H), 6.23(m, 2H), 6.78(m, 1H), 7.46(dd, J=6.7, 6.7, 1H), 7.49(dd, J=6.7, 6.7, 1H), 7.69(d, J=6.7, 1H), 7.73(d, J=6.7, 1H), 7.96(d, J=8.5, 1H), 8.07(d, J=9.2, 1H)

【0147】5-2. 2-フェニルインドールの変換産物 (図6)

大腸菌 (pKF2072) と 2-フェニルインドールの混合培養液 700ml に等量のメタノールを添加し、室温で 2 時間 10 攪拌した。これを 7,000 rpm, 10 min 遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下 300 ml まで濃縮し、等量の酢酸エチルで 2 度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを 86mg を得た。エキスをシリカゲルカラム (Merck60, φ 2cm x 30cm) に供し、ヘキサノール: 酢酸エチル = 10 : 1 の溶媒で展開することにより、化合物 2 (3-(1H-2-インドリル)-3, 5-シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール) (5mg), 化合物 3 (2-(1H-2-インドリル) フェノール) (10mg), 化合物 4 (2-フェニル-1H-5-インドロール) (7mg) をそれぞれ純粋な物質として単離した。

化合物 2 (3-(1H-2-indolyl)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol) の物性

EI-MS(m/z): 225(M⁺)

¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆)

4.34(2H), 4.70(d, J=5.5, 1H), 4.97(d, J=6.0, 1H), 5.78(d, J=9.2, 1H), 6.01(ddd, J=2.4, 5.5, 9.2), 6.50(d, J=5.5, 1H), 6.61(s, 1H), 6.94(dd, J=7.9, 7.9, 1H), 7.06(d, J=7.9, 7.9, 1H), 7.30(d, J=7.3, 1H), 7.47(d, J=7.3, 1H), 11.11(s, 1H)

化合物 3 (2-(1H-2-indolyl) phenol) の物性

EI-MS(m/z): 209(M⁺)

¹H-NMR: (500MHz, CDCl₃): 5.63(brs, 1H), 6.84(d, J=2.0, 1H), 6.90(d, J=8.5, 1H), 7.02(dd, J=7.3, 7.3, 1H), 7.12(dd, J=7.3, 7.3, 1H), 7.16-7.22(3H), 7.40(d, J=8.5, 1H), 7.63(d, J=7.9, 1H), 7.67(dd, J=2.0, 7.9, 1H)

化合物 4 (2-phenyl-1H-5-indolol) の物性

EI-MS(m/z): 209(M⁺)

¹H-NMR: (500MHz, CDCl₃): 6.60(dd, J=2.4, 8.5, 1H), 6.70(d, J=2.0, 1H), 6.82(d, J=2.4, 1H), 7.17(d, J=8.5, 1H), 7.27(dd, J=7.3, 7.3, 1H), 7.42(dd, J=7.3, 7.3, 2H), 7.79(d, J=7.3, 2H), 8.66(brs, 1H), 11.19(s, 1H)

【0148】5-3. 3-フェニル-1-インダノンの変換産物 (図6)

大腸菌 (pKF2072) と 3-フェニル-1-インダノンの混合培養液 700 ml に等量のメタノールを添加し、室温で 2 時間攪拌した。これを 7,000 rpm, 10 min 遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下 300ml まで濃縮し、等量の酢酸エチルで 2 度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを 57 mg を得た。エキスをシ

リカゲルカラム (Merck60, φ 2cm x 30cm) に供し、ジクロロメタン: 酢酸エチル = 2 : 1 の溶媒で展開することにより、化合物 5 (3-(5, 6-ジヒドロキシ-1, 3-シクロヘキサジエンル)-1-インダノン) (10mg) を純粋な物質として単離した。

化合物 5 (3-(5,6-dihydroxy-1,3-cyclohexadienyl)-1-indanone) の物性

EI-MS(m/z): 242(M⁺)

¹H-NMR: (500MHz, CDCl₃): 2.68(dd, J=3.1, 18.9, 1H), 3.01(dd, J=7.9, 18.9, 1H), 4.174.28(3H), 5.70(d, J=4.9, 1H), 5.91(m, 1H), 5.95(m, 1H), 7.38(dd, J=7.3, 7.3, 1H), 7.45(d, J=7.3, 1H), 7.58(dd, J=7.3, 7.3, 1H), 7.74(d, J=7.3, 1H)

【0149】5-4. 2-フェニルベンゾチアゾールの変換産物 (図6)

大腸菌 (pKF6622) と 2-フェニルベンゾチアゾールの混合培養液 700 ml に等量のメタノールを添加し、室温で 2 時間攪拌した。これを 7,000 rpm, 10 min 遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下 300ml まで濃縮し、等量の酢酸エチルで 2 度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを 68 mg を得た。エキスをシリカゲルカラム (Merck60, φ 2cm x 30cm) に供し、ジクロロメタン: 酢酸エチル = 5 : 1 の溶媒で展開することにより、化合物 6 (3-(1, 3-ベンゾチアゾール-2-イル)-3, 5-シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール) (32.5mg) を純粋な物質として単離した。

化合物 6 (3-(1,3-benzothiazol-2-yl)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol) の物性

EI-MS(m/z): 245(M⁺)

¹H-NMR: (500MHz, CDCl₃): 4.51(m, 1H), 5.00(d, J=6.1, 1H), 6.21(dd, J=4.9, 9.2, 1H), 6.26(dd, J=4.3, 9.2, 1H), 6.78(d, J=4.9, 1H), 7.34(dd, J=7.3, 7.3, 1H), 7.44(dd, J=7.3, 7.3), 7.81(d, J=7.3, 1H), 7.94(d, J=7.3, 1H)

【0150】5-5. 2-フェニルベンゾキサゾールの変換産物 (図6)

大腸菌 (pKF2072) と 2-フェニルベンゾキサゾールとの混合培養液 700 ml に等量のメタノールを添加し、室温で 2 時間攪拌した。これを 7,000 rpm, 10 min 遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下 300 ml まで濃縮し、等量の酢酸エチルで 2 度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを 65.4 mg を得た。エキスをシリカゲルカラム (Merck60, φ 2cm x 30cm) に供し、CH₂Cl₂: 酢酸エチル = 1 : 1 の溶媒で展開することにより、化合物 7 (3-(1, 3-ベンゾオキサゾール-2-イル)-3, 5-シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール) (26.1mg) を純粋な物質として単離した。

化合物 7 (3-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol) の物性

EI-MS(m/z): 229(M⁺)

¹H-NMR: (500MHz, DMSO-d₆)

4.41(m,1H), 4.62(dd,J=5.5, 5.5,1H), 4.97(d,J=5.5,1H), 5.18(d,J=7.1,1H), 6.08-6.15(2H), 7.10(d,J=4.9,1H), 7.33-7.40(2H), 7.68(dd,J=2.0, 6.7,1H), 7.72(dd,J=2.0, 6.7,1H)

【0151】5-6. 2-フェニルピリジンの変換産物 (図6)

大腸菌 (pKF2072) と 2-フェニルピリジンの混合培養液 700 ml に等量のメタノールを添加し、室温で 2 時間 10 攪拌した。これを 7,000 rpm, 10 min 遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下 300 ml まで濃縮し、等量の酢酸エチルで 2 度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを 50mg を得た。エキスをシリカゲルカラム (Merck60, ϕ 2cm x 30cm) に供し、CH₂Cl₂:MeOH=40:1 の溶媒で展開することにより、化合物 8 (3-(2-ピリジル)-3, 5-シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール) (10mg) を純粋な物質として単離した。化合物 8 (3-(2-pyridyl)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol) の物性

EI-MS(m/z) 189(M⁺)

¹H-NMR (500MHz, DMSO-d₆)

4.34(dd,J=2.5,5.5,1H), 4.56(d,J=5.5,1H), 5.89(d,J=10.2,1H), 6.04(ddd,J=3.0,5.5,9.8), 6.92(d,J=5.5,1H), 7.21(dd,J=4.9,8.0,1H), 7.63(d,J=8.0,1H), 7.75(d,J=8.0,8.0,1H), 8.54(d,J=4.9,1H)

【0152】5-7. 3-メチル-2-フェニルピリジンの変換産物 (図6)

大腸菌 (pKF2072) と 3-メチル-2-フェニルピリジンとの混合培養液 70 ml に等量のメタノールを添加し、室温で 2 時間攪拌した。この 70 μ l を用いて HPLC 分析を行った。産物のピークは、保持時間 5.88 分に見い出され、290 nm に吸収極大値 (λ_{max}) を示した。化合物 8 の吸収スペクトル (λ_{max} = 295 nm) との比較、及び保持時間より、化合物 9 の構造は、3-(3-メチルピリド-2-イル)-3, 5-シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール [3-(3-methylpyrid-2-yl)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol] であると結論された。

【0153】5-8. 4-フェニルピリジンの変換産物 (図6)

大腸菌 (pKF2072) と 4-フェニルピリジンの混合培養液 700 ml に等量のメタノールを添加し、室温で 2 時間攪拌した。これを 7,000 rpm, 10 min 遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下 300 ml まで濃縮し、等量の酢酸エチルで 2 度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを 23.5 mg を得た。エキスをシリカゲルカラム (Merck60, ϕ 2cm x 30cm) に供し、CH₂Cl₂:MeOH=30:1 の溶媒で展開することにより、化合物 10 (3-(4-ピリミジニル)-3, 5-シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール) (6.6mg) を純粋な物質として単離した。

化合物 10 (3-(4-pyrimidinyl)-3,5-cyclohexadiene-1,2

-diol) の物性

EI-MS:190(M⁺)

¹H-NMR: (500MHz, CDCl₃)

4.54(d,J=6.0,1H), 4.84(d,J=6.0,1H), 6.16-6.24(2H), 6.91(d,J=4.9,1H), 7.52(dd,J=1.8,5.5,1H), 8.66(d,J=5.5,1H), 9.11(d,J=1.8,1H)

【0154】5-9. 1-フェニルピロールの変換産物 (図6)

大腸菌 (pKF2072) と 1-フェニルピロールの混合培養液 700 ml に等量のメタノールを添加し、室温で 2 時間攪拌した。これを 7,000 rpm, 10 min 遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下 300ml まで濃縮し、等量の酢酸エチルで 2 度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを 25 mg を得た。エキスをシリカゲルカラム (Merck60, ϕ 2cm x 30cm) に供し、ヘキサン:酢酸エチル=10:1 の溶媒で展開することにより、化合物 11 (3-(1H-1-ピロリル)-3, 5-シクロヘキサジエン-1, 2-ジオール) (5 mg) を純粋な物質として単離した。

20 化合物 11 (3-(1H-1-pyrrolyl)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol) の物性

EI-MS(m/z): 163(M⁺)

¹H-NMR: (500MHz, CDCl₃): 4.44(d,J=6.1,1H), 4.62(dd,d,J=3.0,3.0,6.1,1H), 5.71(dd,J=2.4,9.8,1H), 5.91(d,J=6.1,1H), 5.97(ddd,J=2.4,6.1,9.8,1H), 6.26(dd,J=2.4,2.4,2H), 6.99(dd,J=2.4,2.4,2H)

【0155】5-10. 1-フェニルピラゾールの変換産物 (図7)

大腸菌 (pKF2072) と 1-フェニルピラゾールの混合培養液 700 ml に等量のメタノールを添加し、室温で 2 時間攪拌した。培養液 700 ml に等量のメタノールを添加し、室温で 2 時間攪拌した。これを 7000 rpm, 10min 遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下 300 ml まで濃縮し、等量の酢酸エチルで 2 度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを 55mg を得た。エキスをシリカゲルカラム (Merck60, ϕ 2cm x 30cm) に供し、ヘキサン:酢酸エチル=2:1 の溶媒で展開することにより、化合物 12 (4-ヒドロキシ-1-フェニルピラゾール) (7.0 mg) を純粋な物質として単離した。

40 化合物 12 (4-hydroxy-1-phenyl pyrazole) の物性

EI-MS(m/z): 160

¹H-NMR: (500MHz, CDCl₃)

7.16-7.22(1H), 7.34-7.38(3H), 7.50-7.55(3H)

【0156】5-11. 3-メチル-1-フェニルピラゾールの変換産物 (図7)

大腸菌 (pKF2072) と 3-メチル-1-フェニルピラゾールの混合培養液 700ml に等量のメタノールを添加し、室温で 2 時間攪拌した。これを 7,000 rpm, 10min 遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下 300 ml まで濃縮し、等量の酢酸エチルで 2 度抽出した。酢酸エチル層を

減圧下濃縮し、生成物含有エキスを68mgを得た。エキスをシリカゲルカラム (Merck60, ϕ 2cm x 30cm) に供し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 20 : 1$ (stepwise) の溶媒で展開することにより、化合物13 (3-(3-methylpyrazol-1-yl)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol) (18mg), 化合物14 (2-(3-methylpyrazol-1-yl)-phenol) (19mg) を純粋な物質として単離した。

化合物13 (3-(3-methylpyrazol-1-yl)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol) の物性

EI-MS(m/z): 192(M^+)

$^1\text{H-NMR}$: (500MHz, CDCl_3)

2.28(s, 3H), 4.54(m, 1H), 4.81(d, J=6.0, 1H), 5.86(dd, J=3.0, 5.0, 1H), 6.00-6.08(2H), 6.15(d, J=2.5, 1H), 7.65(d, J=2.5, 1H)

化合物14 (2-(3-methylpyrazol-1-yl)-phenol) の物性

EI-MS(m/z): 174(M^+)

$^1\text{H-NMR}$: (500MHz, CDCl_3)

2.31(s, 3H), 6.20(d, J=2.5, 1H), 6.82(dd, J=7.4, 7.4, 1H), 7.03(d, J=7.4, 1H), 7.09(dd, J=7.4, 7.4, 1H), 7.25(d, J=7.4, 1H), 7.81(d, J=2.5, 1H), 11.53(s, 1H)

【0157】 5-12. 2-ベンジルピリジンの変換産物 (図7)

大腸菌 (pKF2072) と 2-ベンジルピリジンの混合培養液 700 ml に等量のメタノールを添加し、室温で2時間撹拌した。これを7000 rpm, 10 min遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下300 mlまで濃縮し、等量の酢酸エチルで2度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを55 mgを得た。エキスをシリカゲルカラム (Merck60, ϕ 2cm x 30cm) に供し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 50 : 1$ の溶媒で展開することにより、化合物15 (3-(2-pyridylmethyl)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol) (5.6mg) を純粋な物質として単離した。

化合物15 (3-(2-pyridylmethyl)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol) の物性

EI-MS(m/z): 203(M^+)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6)

3.55-3.62(2H), 3.82(m, 1H), 4.03(m, 1H), 5.57(d, J=4.9, 1H), 5.66(dd, J=3.0, 9.7, 1H), 5.80(m, 1H), 7.21(dd, J=5.5, 6.0, 1H), 7.27(d, J=7.6, 1H), 7.70(ddd, J=4.9, 6.0, 7.6, 1H), 8.46(d, J=5.5, 1H)

【0158】 5-13. 1-ベンジルイミダゾールの変換産物 (図7)

大腸菌 (pKF2072) と 1-ベンジルイミダゾールの混合培養液 700 ml に等量のメタノールを添加し、室温で2時間撹拌した。これを7,000 rpm, 10 min遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下300 mlまで濃縮し、等量の酢酸エチルで2度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを65mgを得た。エキスをシリカゲル

ルカラム (Merck60, ϕ 2cm x 30cm) に供し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 7 : 1$ の溶媒で展開することにより、化合物16 (3-(1H-1-imidazolylmethyl)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol) (2mg) を純粋な物質として単離した。

化合物16 (3-(1H-1-imidazolylmethyl)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol) の物性

EI-MS(m/z): 192(M^+)

$^1\text{H-NMR}$ (500MHz, DMSO-d_6)

10 3.72(m, 1H), 4.00(m, 1H), 4.62(d, J=15.9, 1H), 4.77(d, J=15.9, 1H), 5.58(d, J=5.5, 1H), 5.75(dd, J=3.0, 9.1, 1H), 5.82(m, 1H), 6.89(s, 1H), 7.10(s, 1H), 7.61(s, 1H)

【0159】 5-14. 4-ベンジルイソチアゾールの変換産物 (図7)

大腸菌 (pKF2072) と 4-ベンジルイソチアゾールの混合培養液700 mlに等量のメタノールを添加し、室温で2時間撹拌した。これを7,000 rpm, 10 min遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下300mlまで濃縮し、等量の酢酸エチルで2度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを34mgを得た。エキスをシリカゲルカラム (Merck60, ϕ 2cm x 30cm) に供し、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 40 : 1$ の溶媒で展開することにより、化合物17 (3-(4-isothiazolylmethyl)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol) (8.0mg), 化合物18 (2-(4-isothiazolylmethyl)-phenol) (6.5mg) を純粋な物質として単離した。

化合物17 (3-(4-isothiazolylmethyl)-3,5-cyclohexadiene-1,2-diol) の物性

EI-MS(m/z): 209(M^+)

$^1\text{H-NMR}$: (500MHz, DMSO-d_6)

30 3.52(d, J=16.5, 1H), 3.62(d, J=16.5, 1H), 3.78(dd, J=6.0, 6.0, 1H), 4.03(m, 1H), 4.61(d, J=6.7, 1H), 4.66(d, J=6.0, 1H), 5.55(d, J=5.5, 1H), 5.68(dd, J=3.0, 9.8, 1H), 5.80(dd, J=5.5, 9.8, 1H), 8.42(s, 1H), 8.70(s, 1H)

化合物18 (2-(4-isothiazolylmethyl)phenol) の物性

EI-MS(m/z): 191(M^+)

$^1\text{H-NMR}$: (500MHz, DMSO-d_6)

40 3.93(s, 2H), 6.71(dd, J=7.4, 7.4, 1H), 6.80(d, J=7.4, 1H), 7.02(dd, J=7.4, 1H), 7.06(d, J=7.4, 1H), 8.43(s, 1H), 8.59(s, 1H), 8.72(s, 1H)

【0160】 5-15. 2-(2-ヒドロキシフェニル)ベンゾキサゾールの変換産物 (図7)

大腸菌 (pKF2072) と 2-(2-ヒドロキシフェニル)ベンゾキサゾールの混合培養液 700 ml に等量のメタノールを添加し、室温で2時間撹拌した。これを7,000 rpm, 10 min遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下300 mlまで濃縮し、等量の酢酸エチルで2度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを40 mgを得た。エキスをシリカゲルカラム (Merck60, ϕ 2cm x 30cm) に供し、ジクロロメタン: 酢酸エチル = 10 : 1

の溶媒で展開することにより、化合物19 (2-(2-ヒドロキシフェニル)-4,5-ジヒドロ-1,3-ベンゾオキサゾール-4,5-ジオール) (7.8mg)を純粋な物質として単離した。

化合物19 (2-(2-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-1,3-benzoxazole-4,5-diol)の物性

EI-MS(m/z): 243(M⁺)

¹H-NMR: (500MHz, DMSO-d₆): 4.50(2H), 5.22(d, J=5.5, 1H), 5.33(d, J=6.7, 1H), 5.95(d, J=10.0, 1H), 6.57(dd, J=2.4, 10.0, 1H), 7.00(dd, J=7.3, 7.3, 1H), 7.04(d, J=8.1H), 7.39(dd, J=7.3, 8.6, 1H), 7.79(d, J=7.3, 1H), 10.92(s, 1H)

【0161】5-16. 2-(p-トリル)ピリジンの変換産物(図7)

大腸菌(pKF2072)と2-(p-トリル)ピリジンの混合培養液 700 mlに等量のメタノールを添加し、室温で2時間攪拌した。これを7,000 rpm, 10 min遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下300mlまで濃縮し、等量の酢酸エチルで2度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを65mgを得た。エキスをシリカゲルカラム(Merck60, φ2cm x 30cm)に供し、ジクロロメタンで展開することにより、化合物20 (2-(4-メチルフェニル)-3-ピリジオール) (9mg)を純粋な物質として単離した。

化合物20 (2-(4-methylphenyl)-3-pyridiol)の物性

EI-MS(m/z): 185(M⁺)

¹H-NMR: (500MHz, DMSO-d₆): 2.33(s, 3H), 7.15(dd, J=4.3, 7.9, 1H), 7.21(d, J=7.9, 2H), 7.29(d, J=7.9, 1H), 7.91(d, J=7.9, 2H), 8.11(d, J=4.3, 1H), 10.06(s, 1H)

【0162】5-17. 2-n-ブチルベンゾフランの変換産物(図7)

大腸菌(pKF2072)と2-n-ブチルベンゾフランの混合培養液 700 mlに等量のメタノールを添加し、室温で2時間攪拌した。これを7,000 rpm, 10 min遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下300 mlまで濃縮し、等量の酢酸エチルで2度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを45 mgを得た。エキスをシリカゲルカラム(Merck60, φ2cm x 30cm)に供し、ヘキサン:酢酸エチル=10:1の溶媒で展開することにより、化合物21 (2-ブチルベンゾ[b]フラン-6-オール) (17mg), 化合物22 (2-ブチルベンゾ[b]フラン-5-オール) (5mg)をそれぞれ純粋な物質として単離した。

化合物21 (2-butylbenzo[b]furan-6-ol)の物性

EI-MS(m/z): 190(M⁺)

¹H-NMR: (500MHz, CDCl₃): 0.91(t, J=7.3, 3H), 1.37(m, 2H), 1.67(m, 2H), 2.68(m, 2H), 4.81(s, 1H), 6.24(s, 1H), 6.67(dd, J=2.4, 7.9, 1H), 6.88(s, 1H), 7.24(d, J=7.9, 1H)

22 (2-butylbenzo[b]furan-5-ol)の物性

EI-MS(m/z): 190(M⁺)

¹H-NMR: (500MHz, CDCl₃): 0.91(t, J=7.3, 3H), 1.37(m, 2H), 1.67(m, 2H), 2.67(m, 2H), 4.58(s, 1H), 6.23(s, 1H), 6.76(dd, J=2.0, 8.0, 1H), 6.84(d, J=2.0, 1H), 7.21(d, J=8.0, 1H)

【0163】5-18. 3-n-ヘキシルチオフェンの変換産物(図7)

大腸菌(pKF2072)と3-n-ヘキシルチオフェンの混合培養液 700 mlに等量のメタノールを添加し、室温で2時間攪拌した。これを7,000 rpm, 10 min遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下300 mlまで濃縮し、等量の酢酸エチルで2度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを37.5 mgを得た。エキスをシリカゲルカラム(Merck60, φ2cm x 30cm)に供し、ヘキサン:酢酸エチル=5:1の溶媒で展開することにより、化合物23 (4-ヘキシル-2,3-ジヒドロ-2,3-チオフェンジオール) (10mg)を純粋な物質として単離した。

【0164】化合物23 (4-hexyl-2,3-dihydro-2,3-thiophenediol)の物性

EI-MS(m/z): 202(M⁺)

¹H-NMR: (500MHz, CDCl₃)

0.88(t, J=7.3, 3H), 1.22-1.55(8H), 2.16(t, J=7.3, 2H), 4.53(s, 1H), 5.54(s, 1H), 5.82(s, 1H)

【0165】実施例6: 各種変換産物の立体構造の決定
1, 2-ジヒドロキシ-3, 5-シクロヘキサジエン構造を有する化合物の絶対立体配置を決定するために、まずこれらの化合物を(R)-2NMA(メトキシ-2-ナフチル酢酸)および(s)-2NMAとのジエステル体へ導き、その¹H-NMRを計測した。それぞれのエステル化合物のシグナルの化学シフト値(δ)を正確に計測し、Δδ(δ Re ster-δ Sester)を算出した。このΔδ値の分布を検討することによりその絶対立体配置を決定することができた(図6および図7参照)。図6および図7中の番号は実施例5の化合物番号に対応する。

【0166】実施例7: 組換え放線菌を用いた変換実験
プラスミドpKF2072をSacI/SmaIで二重消化後、modified bphA1::bphA2A3A4を含む4.06 kb断片を切り出した。そして、放線菌用ベクターpIJ6021 (E. Takano, J. White, C. J. Thompson, M. J. Bibb, Gene, 166, 133-137, 1995 参照)をNdeI-HindIIIで二重消化後、上記の4.06 kb-SacI-HindIII断片と、合成DNA 5'-TATGAGCT-3'を加えてアニーリング後、Klenow断片酵素で処理した後、ligation反応を行った。大腸菌JM109株を形質転換後、目的とするプラスミドpIJ-2072を得た。pIJ-2072において、放線菌の強力なプロモーター P_{tipA}とそのリボソーム結合部位のすぐ下流に、modified bphA1 遺伝子が置かれ、bphA2A3A4 遺伝子と続くようにデザインされている。すなわち、5'の結合部位は、GAGAAGGAGCGGA CATATGAGCTCATC となっている。下線は、リボソーム結

合部位であり、18~20番目のATGから modified bphA1 遺伝子が始まっている。このプラスミドpIJ-2072を用いて、放線菌Streptomyces lividans TK21 (D. A. Hopwood, M. J. Bibb, K. F. Chater et al, Genetic manipulation of Streptomyces: A laboratory manual, The John Innes Institute, Norwich, 1985 参照) を形質転換した。

【0167】得られた形質転換体を 5 μ g/ml のカナマイシンを含むYEME培地 (前述のHopwoodらの単行本参照) で 30℃で 対数期後半まで培養後、P_{tipA} プロモーターの誘導をかけるため5 μ g/ml のチオストレプトン (thiostrepton) を加え、さらに、30℃で 24時間培養した。そして、菌体を最小培地 (前述のHopwoodらの単行本参照) で洗浄した後、再び、この最小培地に 菌体濃度が 10 mg(生重量)/mlになるように懸濁し、さらに、最終濃度が0.1 mg/mlになるように、基質の例として 2-フェニルキノリンを加え、30℃で 2日間培養した。実施例2、実施例3に示した方法により、培養物から脂溶性画分を抽出後 HPLC分析を行った。その結果、2-フェニルキノリンは、ほぼ 100%、ジオール体 (図6の 1) に変換されたことがわかった。

【0168】実施例8：フラボノイドの変換反応

8-1. フラボノイドの変換実験

実施例7に示した方法と同様の方法により、組換え放線菌(pIJ-2072)を用いて、フラボン、フラバノン、6-ヒドロキシフラバノン(図8)の変換実験を行った。より詳細には、これらの基質を、それぞれ、1 mMの最終濃度で、菌体 [10 mg(生重量)/ml]入りの最小培地 1000 mlに加え、30℃、2日間、共存培養を行うことにより変換実験を行った。

【0169】8-2. フラボンの変換産物(図9)

組換え放線菌とフラボンとの混合培養液1000 mlに等量のメタノールを添加し、室温で2時間攪拌した。これを7000 rpm, 10 min遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下300 mlまで濃縮し、等量の酢酸エチルで2度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを250 mgを得た。エキスをシリカゲルカラム [Silica Gel 60 (Merck), ϕ 2 cm x 15 cm] に供し、ヘキサン：酢酸エチル=3:1 \rightarrow 1:1の溶媒で展開することにより、24 (12 mg)、25 (2.4 mg)を純粋な物質として単離した。24、25は各種スペクトルデータ(EI-MS, NMR)の解析により、それぞれ

24: 2', 3'-ジヒドロキシフラボン (2', 3'-dihydroxyflavone)

25: 3'-ヒドロキシフラボン (3'-hydroxyflavone) と同定した。

【0170】8-3. フラバノンの変換産物(図9)

組換え放線菌とフラバノンとの混合培養液1000 mlに等量のメタノールを添加し、室温で2時間攪拌した。これを7000 rpm, 10min遠心分離し、上清を回収した。上清

は減圧下300 mlまで濃縮し、等量の酢酸エチルで2度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを300 mgを得た。エキスをシリカゲルカラム [Silica Gel 60 (Merck), ϕ 2 cm x 15 cm] に供し、ヘキサン：酢酸エチル=3:1の溶媒で展開することにより、26 (13.2 mg)、27 (4.4 mg)、28 (4.6mg)を純粋な物質として単離した。26、27、28は各種スペクトルデータ(EI-MS, NMR)の解析により、それぞれ

26: 2', 3'-ジヒドロキシフラバノン (2', 3'-dihydroxyflavanone)

27: 2'-ヒドロキシフラバノン (2'-hydroxyflavanone)

28: 3'-ヒドロキシフラバノン (3'-hydroxyflavanone) と同定した。

【0171】26 [2', 3'-dihydroxyflavanone]の物性
EI-MS (m/z): 256 (M⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆)

2.76 (dd, J=3.0, 16.5, 1H), 3.16 (dd, J=13.0, 16.5, 1H), 5.78 (dd, J=3.0, 13.0, 1H), 6.70 (dd, J=7.9, 7.9), 6.80 (dd, J=1.2, 7.9, 1H), 6.93 (dd, J=1.2, 7.9, 1H), 7.07 (d, J=7.9), 7.08 (dd, J=7.9, 7.9, 1H), 7.57 (ddd, J=1.8, 7.9, 7.9), 7.79 (dd, J=1.8, 7.9, 1H)

【0172】8-4. 6-ヒドロキシフラバノンの変換産物(図9)

組換え放線菌と6-ヒドロキシフラバノンとの混合培養液1000 mlに等量のメタノールを添加し、室温で2時間攪拌した。これを7000 rpm, 10 min遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下300mlまで濃縮し、等量の酢酸エチルで2度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを250 mgを得た。エキスをシリカゲルカラム [Silica Gel 60 (Merck), ϕ 2 cm x 15 cm] に供し、ジクロロメタン：メタノール=50:1の溶媒で展開することにより、29 (8.5mg)、30(9.0 mg)を純粋な物質として単離した。29、30は各種スペクトルデータ(EI-MS, NMR)の解析により、

29: 2', 6-ジヒドロキシフラバノン (2', 6-dihydroxyflavanone)

30: 3', 6-ジヒドロキシフラバノン (3', 6-dihydroxyflavanone) と同定した。

【0173】実施例9：芳香族アミンの変換反応

9-1. 芳香族アミンのフタル酸イミド体の作製

芳香族アミン(1級アミノ基を含有する芳香環化合物)と等モルの無水フタル酸をナスフラスコ中で、150℃、3時間加熱した。生成物はシリカゲルカラム [Silica Gel 60(Merck), ϕ 2cm x 20cm, ヘキサン：酢酸エチル=5:1] にて精製した。試験したすべての化合物で反応はほぼ定量的であった。なお、アミノ化合物のフタル酸イミド誘導体はアルコール溶媒中で抱水ヒドラジン処理することにより、容易にフリー体へと導くことができ

る。

【0174】9-2. 芳香族アミンの変換実験

実施例7に示した方法と同様の方法により、組換え放線菌(pIJ-2072)を用いて、9-1で作製した芳香族アミンフタル酸イミドである、フェニルエチルアミンのフタル酸イミド体 [2-(1-フェニルエチル)-1,3-イソインドリンジオン] およびテトラヒドロナフチルアミンのフタル酸イミド体 [2-(1,2,3,4-テトラヒドロ-1-ナフタレニル)-1,3-イソインドリンジオン] (図8)の変換実験を行った。より詳細には、これらの基質を、それぞれ、0.1 mg/mlの最終濃度で、菌体 [10 mg(生重量)/ml]入りの最小培地 1000 mlに加え、30℃、2日間、共存培養を行うことにより変換実験を行った。

【0175】9-3. フェニルエチルアミンのフタル酸イミド体の変換産物 (図9)

組換え放線菌とフェニルエチルアミンのフタル酸イミド体 [2-(1-フェニルエチル)-1,3-イソインドリンジオン] との混合培養液1000 mlに等量のメタノールを添加し、室温で2時間攪拌した。これを7000 rpm, 10 min遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下300 mlまで濃縮し、等量の酢酸エチルで2度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを350 mgを得た。エキスをシリカゲルカラム[Silica Gel 60(Merck), φ 2cm x 10cm]に供し、ヘキサン：酢酸エチル=3：1の溶媒で展開することにより、31 (4.2 mg)を純粋な物質として単離した。31は各種スペクトルデータ(EI-MS, NMR)の解析により、2-[1-(4-ヒドロキシフェニル)エチル]-1,3-イソインドリンジオン [2-[1-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-1,3-isoin-

dolinedione] と同定した。

【0176】31 [2-[1-(4-hydroxyphenyl)ethyl]-1,3-i-

soindolinedione]の物性

EI-MS (m/z): 267 (M⁺)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃)

1.88 (d, J=7.3, 1H), 5.49 (q, J=7.3, 1H), 6.76 (d, J=8.5, 2H), 7.38 (d, J=8.5, 2H), 7.66 (dd, J=3.1, 5.5, 2H), 7.77 (dd, J=3.1, 5.5, 2H)

【0177】9-4. テトラヒドロナフチルアミンのフタル酸イミド体の変換産物 (図9)

組換え放線菌とテトラヒドロナフチルアミンのフタル酸イミド体 [2-(1,2,3,4-テトラヒドロ-1-ナフタレニル)-1,3-イソインドリンジオン]との混合培養液1000 mlに等量のメタノールを添加し、室温で2時間攪拌した。これを7000 rpm, 10 min遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下300 mlまで濃縮し、等量の酢酸エチルで2度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを350mgを得た。エキスをシリカゲルカラム[Silica Gel 60(Merck), φ 2cm x 10cm]に供し、ヘキサン：酢酸エチル=3：1の溶媒で展開することにより、32 (5.2mg)を純粋な物質として単離した。32は各種スペクトル

データ(EI-MS, NMR)の解析により、

2-(4-ヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロ-1-ナフタレニル)-1,3-イソインドリンジオン [2-(4-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl)-1,3-isoin-

dolinedione] の物性

EI-MS (m/z): 293 (M⁺)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃)

1.82 (m, 1H), 2.17 (m, 1H), 2.36-2.44 (2H), 5.01 (dd, J=4.9, 9.2, 1H), 5.56 (dd, J=6.7, 9.8), 6.93 (d, J=7.9, 1H), 7.14 (dd, J=7.9, 7.9, 1H), 7.26 (d, J=7.9, 7.9, 1H), 7.60 (d, J=7.9, 1H), 7.71 (dd, J=3.0, 5.5, 2H), 7.82 (dd, J=3.0, 5.5, 2H)

【0179】実施例10：芳香族カルボン酸の変換反応

10-1. 芳香族カルボン酸の変換実験

実施例7に示した方法と同様の方法により、組換え放線菌(pIJ-2072)を用いて、芳香族カルボン酸である、1-ナフトイック酸(1-naphthoic acid)または1-ナフチル酢酸(1-naphthylacetate) (図8)の変換実験を行った。より詳細には、これらの基質を、それぞれ、0.1 mg/mlの最終濃度で、菌体 [10 mg(生重量)/ml]入りの最小培地 1000 mlに加え、30℃、2日間、共存培養を行うことにより変換実験を行った。

【0180】10-2. 1-ナフトイック酸の変換産物

組換え放線菌と1-ナフトイック酸との混合培養液1000 mlに等量のメタノールを添加し、室温で2時間攪拌した。これを7000 rpm, 10 min遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下300 mlまで濃縮し、1N HClでpH3.0に調整後等量の酢酸エチルで2度抽出した。酢酸エチル層を減圧下濃縮し、生成物含有エキスを400 mgを得た。エキスをシリカゲルカラム[Silica Gel 60(Merck), φ 2cm x 15cm]に供し、ジクロロメタン：メタノール=15：1の溶媒で展開することにより、33(5.2 mg)を純粋な物質として単離した。33は各種スペクトルデータ(EI-MS, NMR)の解析により、

4-ヒドロキシ-1-ナフトイック酸 (4-hydroxy-1-naphthoic acid)と同定した。

【0181】33 [4-hydroxy-1-naphthoic acid]の物性

EI-MS (m/z): 188 (M⁺)

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆)

6.90 (d, J=7.9, 1H), 7.49 (dd, J=7.3, 7.3), 7.58 (dd, J=7.3, 9.1), 8.12 (d, J=7.9, 1H), 8.22 (d, J=7.3, 1H), 9.02 (d, J=9.1, 1H)

【0182】10-3. 1-ナフチル酢酸の変換産物

組換え放線菌と1-ナフチル酢酸との混合培養液1000 mlに等量のメタノールを添加し、室温で2時間攪拌した。これを7000 rpm, 10 min遠心分離し、上清を回収した。上清は減圧下300 mlまで濃縮し、1N HClでpH3.0に調整後等量の酢酸エチルで2度抽出した。酢酸エチル層を減

庄下濃縮し、生成物含有エキスを380mgを得た。エキスをシリカゲルカラム[Silica Gel 60(Merck), ϕ 2cm x 15 cm]に供し、ジクロロメタン:メタノール=15:1の溶媒で展開することにより、34 (3.6 mg), 35 (2.0 mg)を純粋な物質として単離した。34, 35は各種スペクトルデータ(EI-MS, NMR)の解析により、

34: 4-ヒドロキシ-1-ナフチル酢酸 (4-hydroxy-1-naphthylacetate)

35: 5-ヒドロキシ-1-ナフチル酢酸 (5-hydroxy-1-naphthylacetate) と同定した。

【0183】34 [4-hydroxy-1-naphthylacetate]の物性
EI-MS (m/z): 202 (M⁺)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃)

3.96 (s, 2H), 6.72 (d, J=7.9, 1H), 7.18 (d, J=7.9, 1H), 7.45 (dd, J=7.9, 7.9, 1H), 7.51 (dd, 7.9, 8.5), 7.88 (d, J=8.5, 1H), 8.22 (d, J=7.9, 1H)

【0184】35 [5-hydroxy-1-naphthylacetate]の物性

EI-MS (m/z): 202 (M⁺)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃)

4.03 (s, 2H), 6.80 (d, J=7.3, 1H), 7.30 (dd, J=7.3, 7.3, 1H), 7.39 (2H), 7.51 (d, J=7.3, 1H), 8.16 (dd, J=2.5, 7.9, 1H)

【0185】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kirin Beer Kabushiki Kaisha

<120> A method for producing a heterocyclic compound and an aromatic carboxylic acid having a hydroxyl group(s), and modified aromatic ring dioxygenase

<130> 133206

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1377

<212> DNA

<213> Pseudomonas pseudoalcaligenes

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1377)

<400> 1

atg agc tca gca atc aaa gaa gtg cag gga gcc cct gtg aag tgg gtt	48
Met Ser Ser Ala Ile Lys Glu Val Gln Gly Ala Pro Val Lys Trp Val	
1 5 10 15	
acc aat tgg acg ccg gag gcg atc cgg ggg ttg gtc gat cag gaa aaa	96
Thr Asn Trp Thr Pro Glu Ala Ile Arg Gly Leu Val Asp Gln Glu Lys	
20 25 30	
ggg ctg ctt gat cca cgc atc tac gcc gat cag agt ctt tat gag ctg	144
Gly Leu Leu Asp Pro Arg Ile Tyr Ala Asp Gln Ser Leu Tyr Glu Leu	
35 40 45	
gag ctt gag cgg gtt ttt ggt cgc tct tgg ctg tta ctt ggg cac gag	192
Glu Leu Glu Arg Val Phe Gly Arg Ser Trp Leu Leu Leu Gly His Glu	
50 55 60	
agt cat gtg cct gaa acc ggg gac ttc ctg gcc act tac atg ggc gaa	240
Ser His Val Pro Glu Thr Gly Asp Phe Leu Ala Thr Tyr Met Gly Glu	
65 70 75 80	
gat ccg gtg gtt atg gtg cga cag aaa gac aag agc atc aag gtg ttc	288
Asp Pro Val Val Met Val Arg Gln Lys Asp Lys Ser Ile Lys Val Phe	
85 90 95	
ctg aac cag tgc cgg cac cgc ggc atg cgt atc tgc cgc tcg gac gcc	336
Leu Asn Gln Cys Arg His Arg Gly Met Arg Ile Cys Arg Ser Asp Ala	

55

56

100	105	110	
ggc aac gcc aag gct ttc acc tgc agc tat cac ggc tgg gcc tac gac			384
Gly Asn Ala Lys Ala Phe Thr Cys Ser Tyr His Gly Trp Ala Tyr Asp			
115	120	125	
atc gcc ggc aag ctg gtg aac gtg ccg ttc gag aag gaa gcc ttt tgc			432
Ile Ala Gly Lys Leu Val Asn Val Pro Phe Glu Lys Glu Ala Phe Cys			
130	135	140	
gac aag aaa gaa ggc gac tgc ggc ttt gac aag gcc gaa tgg ggc ccg			480
Asp Lys Lys Glu Gly Asp Cys Gly Phe Asp Lys Ala Glu Trp Gly Pro			
145	150	155	160
ctc cag gca cgc gtg gca acc tac aag ggc ctg gtc ttt gcc aac tgg			528
Leu Gln Ala Arg Val Ala Thr Tyr Lys Gly Leu Val Phe Ala Asn Trp			
165	170	175	
gat gtg cag gcg cca gac ctg gag acc tac ctc ggt gac gcc cgc ccc			576
Asp Val Gln Ala Pro Asp Leu Glu Thr Tyr Leu Gly Asp Ala Arg Pro			
180	185	190	
tat atg gac gtc atg ctg gat cgc acg ccg gcc ggg act gtg gcc atc			624
Tyr Met Asp Val Met Leu Asp Arg Thr Pro Ala Gly Thr Val Ala Ile			
195	200	205	
ggc ggc atg cag aag tgg gtg att ccg tgc aac tgg aag ttt gcc gcc			672
Gly Gly Met Gln Lys Trp Val Ile Pro Cys Asn Trp Lys Phe Ala Ala			
210	215	220	
gag cag ttc tgc agt gac atg tac cac gcc ggc acc atg tcg cac ctg			720
Glu Gln Phe Cys Ser Asp Met Tyr His Ala Gly Thr Met Ser His Leu			
225	230	235	240
tcc gcc atc ctg gcg ggc atg ccg ccg gaa atg gac ctg tcg cat gca			768
Ser Gly Ile Leu Ala Gly Met Pro Pro Glu Met Asp Leu Ser His Ala			
245	250	255	
cag gtg ccc acc aag ggc aac cag ttc cgg gcc ggc tgg ggc ggc cac			816
Gln Val Pro Thr Lys Gly Asn Gln Phe Arg Ala Gly Trp Gly Gly His			
260	265	270	
ggc tcg ggc tgg ttc gtc gac gag ccg ggc atg ctc atg gcg gtg atg			864
Gly Ser Gly Trp Phe Val Asp Glu Pro Gly Met Leu Met Ala Val Met			
275	280	285	
ggg ccc aag gtc acc cag tac tgg acc gaa ggt ccg gct gcc gac ctg			912
Gly Pro Lys Val Thr Gln Tyr Trp Thr Glu Gly Pro Ala Ala Asp Leu			
290	295	300	
gca gaa cag cga ctg ggc cac acc atg ccg gtt cga cgc atg ttc ggc			960
Ala Glu Gln Arg Leu Gly His Thr Met Pro Val Arg Arg Met Phe Gly			
305	310	315	320
cag cac atg agc gtc ttc ccg acc tgc tcg ttc ctc ccg gcc atc aac			1008
Gln His Met Ser Val Phe Pro Thr Cys Ser Phe Leu Pro Ala Ile Asn			
325	330	335	
acc atc cgg acc tgg cac ccg cgc ggc ccc aac gaa atc gaa gtg tgg			1056
Thr Ile Arg Thr Trp His Pro Arg Gly Pro Asn Glu Ile Glu Val Trp			
340	345	350	
gcc ttc acc ttg gtc gat gcc gat gcc ccg gcc gag atc aag gaa gaa			1104
Ala Phe Thr Leu Val Asp Ala Asp Ala Pro Ala Glu Ile Lys Glu Glu			
355	360	365	

57

58

tat cgc cgg cac aac atc cgc acc ttc tcc gca ggc ggc gtg ttt gag 1152
 Tyr Arg Arg His Asn Ile Arg Thr Phe Ser Ala Gly Gly Val Phe Glu
 370 375 380
 cag gac gat ggc gag aac tgg gtg gag atc cag aag ggc cta cgt ggg 1200
 Gln Asp Asp Gly Glu Asn Trp Val Glu Ile Gln Lys Gly Leu Arg Gly
 385 390 395 400
 tac aag gcc aag agc cag ccg ctc aat gcc cag atg ggc ctg ggt cgg 1248
 Tyr Lys Ala Lys Ser Gln Pro Leu Asn Ala Gln Met Gly Leu Gly Arg
 405 410 415
 tcg cag acc ggt cac cct gat ttt cct ggc aac gtc ggc tac gtc tac 1296
 Ser Gln Thr Gly His Pro Asp Phe Pro Gly Asn Val Gly Tyr Val Tyr
 420 425 430
 gcc gaa gaa gcg gcg cgg ggt atg tat cac cac tgg atg cgc atg atg 1344
 Ala Glu Glu Ala Ala Arg Gly Met Tyr His His Trp Met Arg Met Met
 435 440 445
 tcc gag ccc agc tgg gcc acg ctc aag ccc tga 1377
 Ser Glu Pro Ser Trp Ala Thr Leu Lys Pro
 450 455
 <210> 2
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas pseudoalcaligenes
 <400> 2
 Met Ser Ser Ala Ile Lys Glu Val Gln Gly Ala Pro Val Lys Trp Val
 1 5 10 15
 Thr Asn Trp Thr Pro Glu Ala Ile Arg Gly Leu Val Asp Gln Glu Lys
 20 25 30
 Gly Leu Leu Asp Pro Arg Ile Tyr Ala Asp Gln Ser Leu Tyr Glu Leu
 35 40 45
 Glu Leu Glu Arg Val Phe Gly Arg Ser Trp Leu Leu Leu Gly His Glu
 50 55 60
 Ser His Val Pro Glu Thr Gly Asp Phe Leu Ala Thr Tyr Met Gly Glu
 65 70 75 80
 Asp Pro Val Val Met Val Arg Gln Lys Asp Lys Ser Ile Lys Val Phe
 85 90 95
 Leu Asn Gln Cys Arg His Arg Gly Met Arg Ile Cys Arg Ser Asp Ala
 100 105 110
 Gly Asn Ala Lys Ala Phe Thr Cys Ser Tyr His Gly Trp Ala Tyr Asp
 115 120 125
 Ile Ala Gly Lys Leu Val Asn Val Pro Phe Glu Lys Glu Ala Phe Cys
 130 135 140
 Asp Lys Lys Glu Gly Asp Cys Gly Phe Asp Lys Ala Glu Trp Gly Pro
 145 150 155 160
 Leu Gln Ala Arg Val Ala Thr Tyr Lys Gly Leu Val Phe Ala Asn Trp
 165 170 175
 Asp Val Gln Ala Pro Asp Leu Glu Thr Tyr Leu Gly Asp Ala Arg Pro
 180 185 190
 Tyr Met Asp Val Met Leu Asp Arg Thr Pro Ala Gly Thr Val Ala Ile
 195 200 205
 Gly Gly Met Gln Lys Trp Val Ile Pro Cys Asn Trp Lys Phe Ala Ala

210 215 220
 Glu Gln Phe Cys Ser Asp Met Tyr His Ala Gly Thr Met Ser His Leu
 225 230 235 240
 Ser Gly Ile Leu Ala Gly Met Pro Pro Glu Met Asp Leu Ser His Ala
 245 250 255
 Gln Val Pro Thr Lys Gly Asn Gln Phe Arg Ala Gly Trp Gly Gly His
 260 265 270
 Gly Ser Gly Trp Phe Val Asp Glu Pro Gly Met Leu Met Ala Val Met
 275 280 285
 Gly Pro Lys Val Thr Gln Tyr Trp Thr Glu Gly Pro Ala Ala Asp Leu
 290 295 300
 Ala Glu Gln Arg Leu Gly His Thr Met Pro Val Arg Arg Met Phe Gly
 305 310 315 320
 Gln His Met Ser Val Phe Pro Thr Cys Ser Phe Leu Pro Ala Ile Asn
 325 330 335
 Thr Ile Arg Thr Trp His Pro Arg Gly Pro Asn Glu Ile Glu Val Trp
 340 345 350
 Ala Phe Thr Leu Val Asp Ala Asp Ala Pro Ala Glu Ile Lys Glu Glu
 355 360 365
 Tyr Arg Arg His Asn Ile Arg Thr Phe Ser Ala Gly Gly Val Phe Glu
 370 375 380
 Gln Asp Asp Gly Glu Asn Trp Val Glu Ile Gln Lys Gly Leu Arg Gly
 385 390 395 400
 Tyr Lys Ala Lys Ser Gln Pro Leu Asn Ala Gln Met Gly Leu Gly Arg
 405 410 415
 Ser Gln Thr Gly His Pro Asp Phe Pro Gly Asn Val Gly Tyr Val Tyr
 420 425 430
 Ala Glu Glu Ala Ala Arg Gly Met Tyr His His Trp Met Arg Met Met
 435 440 445
 Ser Glu Pro Ser Trp Ala Thr Leu Lys Pro
 450 455
 <210> 3
 <211> 642
 <212> DNA
 <213> *Pseudomonas alcaligenes*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (642)
 <400> 3
 atg gtg ggc tgg acg tgc atg tgc aga cgg cgc gcc gag gtt ccg tcc 48
 Met Val Gly Trp Thr Cys Met Cys Arg Arg Arg Ala Glu Val Pro Ser
 1 5 10 15
 cct gat att tac ttg gag ata act gtt atg aca aat cca tcc ccg cat 96
 Pro Asp Ile Tyr Leu Glu Ile Thr Val Met Thr Asn Pro Ser Pro His
 20 25 30
 ttt ttc aaa aca ttt gaa tgg cca agc aag gcg gct ggc ctt gag ttg 144
 Phe Phe Lys Thr Phe Glu Trp Pro Ser Lys Ala Ala Gly Leu Glu Leu
 35 40 45
 cag aac gag atc gag cag ttc tac tac cgc gaa gcg cag ttg ctt gac 192
 Gln Asn Glu Ile Glu Gln Phe Tyr Tyr Arg Glu Ala Gln Leu Leu Asp

61 62

50 55 60

cac cgg gcc tac gag gcc tgg ttt gcc ctg ctg gac aaa gat atc cac 240
 His Arg Ala Tyr Glu Ala Trp Phe Ala Leu Leu Asp Lys Asp Ile His
 65 70 75 80
 tac ttc atg ccg ctg cgc acc aat cgc atg atc cgg gag ggc gag ctg 288
 Tyr Phe Met Pro Leu Arg Thr Asn Arg Met Ile Arg Glu Gly Glu Leu
 85 90 95
 gaa tat tcc ggc gac cag gat gtt gcc cat ttc gat gaa acc cat gaa 336
 Glu Tyr Ser Gly Asp Gln Asp Val Ala His Phe Asp Glu Thr His Glu
 100 105 110
 acc atg tac ggg cgc atc cgc aag gtg acc tcg gac gtg ggc tgg gcg 384
 Thr Met Tyr Gly Arg Ile Arg Lys Val Thr Ser Asp Val Gly Trp Ala
 115 120 125
 gag aac ccg cct tcc cgc acg cgc cac ctg gtc tcc aac gtc atc gtc 432
 Glu Asn Pro Pro Ser Arg Thr Arg His Leu Val Ser Asn Val Ile Val
 130 135 140
 aag gag acg gcc acg ccg gat acc ttc gag gtc aat tcc gca ttc atc 480
 Lys Glu Thr Ala Thr Pro Asp Thr Phe Glu Val Asn Ser Ala Phe Ile
 145 150 155 160
 ctg tac cgc aat cgg ctt gag cgc cag gtc gac atc ttc gcg ggc gaa 528
 Leu Tyr Arg Asn Arg Leu Glu Arg Gln Val Asp Ile Phe Ala Gly Glu
 165 170 175
 cgc cgg gac gtg ctg cgc cgc gcc gac aac aac ctt ggt ttc agc atc 576
 Arg Arg Asp Val Leu Arg Arg Ala Asp Asn Asn Leu Gly Phe Ser Ile
 180 185 190
 gcc aag cgc acc atc ctg ctc gac gcc agt acc ttg ctg tcg aac aac 624
 Ala Lys Arg Thr Ile Leu Leu Asp Ala Ser Thr Leu Leu Ser Asn Asn
 195 200 205
 ctg agc atg ttc ttc tag 642
 Leu Ser Met Phe Phe
 210
 <210> 4
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas alcaligenes*
 <400> 4
 Met Val Gly Trp Thr Cys Met Cys Arg Arg Arg Ala Glu Val Pro Ser
 1 5 10 15
 Pro Asp Ile Tyr Leu Glu Ile Thr Val Met Thr Asn Pro Ser Pro His
 20 25 30
 Phe Phe Lys Thr Phe Glu Trp Pro Ser Lys Ala Ala Gly Leu Glu Leu
 35 40 45
 Gln Asn Glu Ile Glu Gln Phe Tyr Tyr Arg Glu Ala Gln Leu Leu Asp
 50 55 60
 His Arg Ala Tyr Glu Ala Trp Phe Ala Leu Leu Asp Lys Asp Ile His
 65 70 75 80
 Tyr Phe Met Pro Leu Arg Thr Asn Arg Met Ile Arg Glu Gly Glu Leu
 85 90 95
 Glu Tyr Ser Gly Asp Gln Asp Val Ala His Phe Asp Glu Thr His Glu

63

64

100 105 110
 Thr Met Tyr Gly Arg Ile Arg Lys Val Thr Ser Asp Val Gly Trp Ala
 115 120 125
 Glu Asn Pro Pro Ser Arg Thr Arg His Leu Val Ser Asn Val Ile Val
 130 135 140
 Lys Glu Thr Ala Thr Pro Asp Thr Phe Glu Val Asn Ser Ala Phe Ile
 145 150 155 160
 Leu Tyr Arg Asn Arg Leu Glu Arg Gln Val Asp Ile Phe Ala Gly Glu
 165 170 175
 Arg Arg Asp Val Leu Arg Arg Ala Asp Asn Asn Leu Gly Phe Ser Ile
 180 185 190
 Ala Lys Arg Thr Ile Leu Leu Asp Ala Ser Thr Leu Leu Ser Asn Asn
 195 200 205
 Leu Ser Met Phe Phe
 210
 <210> 5
 <211> 330
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas alcaligenes
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (330)
 <400> 5
 atg aaa ttt acc aga gtt tgt gat cga aga gat gtg ccc gaa ggc gaa 48
 Met Lys Phe Thr Arg Val Cys Asp Arg Arg Asp Val Pro Glu Gly Glu
 1 5 10 15
 gcc ctg aag gtc gaa agt gga ggc acc tcc gtc gcg att ttc aat gtg 96
 Ala Leu Lys Val Glu Ser Gly Gly Thr Ser Val Ala Ile Phe Asn Val
 20 25 30
 gat ggc gag ctg ttc gca aca cag gac cgc tgc acc cac ggc gac tgg 144
 Asp Gly Glu Leu Phe Ala Thr Gln Asp Arg Cys Thr His Gly Asp Trp
 35 40 45
 tcc ctg tcc gat ggc ggc tat ctt gaa ggt gac gtg gtg gaa tgc tca 192
 Ser Leu Ser Asp Gly Gly Tyr Leu Glu Gly Asp Val Val Glu Cys Ser
 50 55 60
 ctg cac atg ggg aag ttt tgc gtt cgc acg ggc aag gtc aaa tca ccg 240
 Leu His Met Gly Lys Phe Cys Val Arg Thr Gly Lys Val Lys Ser Pro
 65 70 75 80
 ccg ccc tgt gag gca ctg aag ata ttt ccg atc cgc atc gaa gac aat 288
 Pro Pro Cys Glu Ala Leu Lys Ile Phe Pro Ile Arg Ile Glu Asp Asn
 85 90 95
 gac gtg ctg gtc gac ttc gaa gcc ggg tat ctg gcg cca tga 330
 Asp Val Leu Val Asp Phe Glu Ala Gly Tyr Leu Ala Pro
 100 105 110
 <210> 6
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Pseudomonas alcaligenes
 <400> 6

65

66

Met Lys Phe Thr Arg Val Cys Asp Arg Arg Asp Val Pro Glu Gly Glu
 1 5 10 15
 Ala Leu Lys Val Glu Ser Gly Gly Thr Ser Val Ala Ile Phe Asn Val
 20 25 30
 Asp Gly Glu Leu Phe Ala Thr Gln Asp Arg Cys Thr His Gly Asp Trp
 35 40 45
 Ser Leu Ser Asp Gly Gly Tyr Leu Glu Gly Asp Val Val Glu Cys Ser
 50 55 60
 Leu His Met Gly Lys Phe Cys Val Arg Thr Gly Lys Val Lys Ser Pro
 65 70 75 80
 Pro Pro Cys Glu Ala Leu Lys Ile Phe Pro Ile Arg Ile Glu Asp Asn
 85 90 95
 Asp Val Leu Val Asp Phe Glu Ala Gly Tyr Leu Ala Pro
 100 105

<210> 7

<211> 1227

<212> DNA

<213> *Pseudomonas alcaligenes*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1227)

<400> 7

atg atc gac acc atc gcc atc atc ggc gcc ggc ctg gcc ggt tcg acg 48
 Met Ile Asp Thr Ile Ala Ile Ile Gly Ala Gly Leu Ala Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 gct gcg cgc gca ctg cgc gcc cag gga tac gag ggg cgc atc cac ctg 96
 Ala Ala Arg Ala Leu Arg Ala Gln Gly Tyr Glu Gly Arg Ile His Leu
 20 25 30
 ctc ggg gat gag tcg cat cag gcc tat gac cgg acc acg ctg tcc aag 144
 Leu Gly Asp Glu Ser His Gln Ala Tyr Asp Arg Thr Thr Leu Ser Lys
 35 40 45
 acg gtg ctg gcg ggc gag cag ccc gag ccg cct gca atc ctg gac agc 192
 Thr Val Leu Ala Gly Glu Gln Pro Glu Pro Pro Ala Ile Leu Asp Ser
 50 55 60
 gcc tgg tac gca tcg gcc cat gtg gat gtc cag ctc ggg cga cgg gtg 240
 Ala Trp Tyr Ala Ser Ala His Val Asp Val Gln Leu Gly Arg Arg Val
 65 70 75 80
 agt tgc ctg gat ctg gcc aac cgc cag att cag ttt gaa tcg ggc gcc 288
 Ser Cys Leu Asp Leu Ala Asn Arg Gln Ile Gln Phe Glu Ser Gly Ala
 85 90 95
 ccg ctg gcc tac gac cgg ctg ctg ctg gcc acc ggc gcg cgc gcc cgg 336
 Pro Leu Ala Tyr Asp Arg Leu Leu Leu Ala Thr Gly Ala Arg Ala Arg
 100 105 110
 cgc atg gcg att cgg ggt ggc gac ctg gca ggc atc cat acc ttg cga 384
 Arg Met Ala Ile Arg Gly Gly Asp Leu Ala Gly Ile His Thr Leu Arg
 115 120 125
 gac ctc gcc gac agc cag gcg ctg cgg cag gcg ctg caa ccg ggc cag 432
 Asp Leu Ala Asp Ser Gln Ala Leu Arg Gln Ala Leu Gln Pro Gly Gln
 130 135 140
 tcg ctg gtc atc gtc ggc gga ggc ctg atc ggt tgc gag gtg gcg acc 480

67

68

Ser Leu Val Ile Val Gly Gly Gly Leu Ile Gly Cys Glu Val Ala Thr
 145 150 155 160
 acc gcc cgc aag ctg agt gtc cat gtc acg att ctg gaa gcc ggc gac 528
 Thr Ala Arg Lys Leu Ser Val His Val Thr Ile Leu Glu Ala Gly Asp
 165 170 175
 gag ttg ctg gtg cgc gtg ctg ggt cac cgg acc ggg gca tgg tgt cgg 576
 Glu Leu Leu Val Arg Val Leu Gly His Arg Thr Gly Ala Trp Cys Arg
 180 185 190
 gcc gaa ctg gaa cgc atg ggt gtc cgc gtg gag cgc aat gca cag gcc 624
 Ala Glu Leu Glu Arg Met Gly Val Arg Val Glu Arg Asn Ala Gln Ala
 195 200 205
 gcg cgc ttc gaa ggc cag ggg cag gtg cgc gcc gtg atc tgc gcc gac 672
 Ala Arg Phe Glu Gly Gln Gly Gln Val Arg Ala Val Ile Cys Ala Asp
 210 215 220
 ggg cgc cgg gtg ccc gcc gat gtg gtc ttg gtc agc att ggc gcc gag 720
 Gly Arg Arg Val Pro Ala Asp Val Val Leu Val Ser Ile Gly Ala Glu
 225 230 235 240
 ccg gcg gac gag ctg gcc cgt gcc gct ggc atc gcc tgc gcg cgc ggc 768
 Pro Ala Asp Glu Leu Ala Arg Ala Ala Gly Ile Ala Cys Ala Arg Gly
 245 250 255
 gtg ctg gtc gac gcc acc ggc gcc acc tcg tgt cca gag gtg ttc gcc 816
 Val Leu Val Asp Ala Thr Gly Ala Thr Ser Cys Pro Glu Val Phe Ala
 260 265 270
 gcc ggt gac gtc gcc gcc tgg ccg ctg cgt caa ggg ggc cag cgc tcg 864
 Ala Gly Asp Val Ala Ala Trp Pro Leu Arg Gln Gly Gly Gln Arg Ser
 275 280 285
 ctg gag acc tac ctg aac agc cag atg gag gcc gaa atc gcg gcc agc 912
 Leu Glu Thr Tyr Leu Asn Ser Gln Met Glu Ala Glu Ile Ala Ala Ser
 290 295 300
 gcc atg ttg agt cag ccc gtg ccg gcg ccc cag gtg ccg acc tcg tgg 960
 Ala Met Leu Ser Gln Pro Val Pro Ala Pro Gln Val Pro Thr Ser Trp
 305 310 315 320
 acg gag att gca ggc cac cgc atc cag atg att ggc gat gcc gaa ggg 1008
 Thr Glu Ile Ala Gly His Arg Ile Gln Met Ile Gly Asp Ala Glu Gly
 325 330 335
 ccc ggc gag atc gtc gta cgc ggc gac gcc cag agc ggc cag cca atc 1056
 Pro Gly Glu Ile Val Val Arg Gly Asp Ala Gln Ser Gly Gln Pro Ile
 340 345 350
 gtg ttg ctc agg ctg ctt gat ggc tgc gtc gag gcc gcg acg gcg atc 1104
 Val Leu Leu Arg Leu Leu Asp Gly Cys Val Glu Ala Ala Thr Ala Ile
 355 360 365
 aat gcc acc agg gaa ttt tct gtg gcg acc cga ctg gtc ggc acc cgg 1152
 Asn Ala Thr Arg Glu Phe Ser Val Ala Thr Arg Leu Val Gly Thr Arg
 370 375 380
 gtt tct gtt tcc gcc gag caa ctg cag gac gtc ggc tcg aac ctg cgg 1200
 Val Ser Val Ser Ala Glu Gln Leu Gln Asp Val Gly Ser Asn Leu Arg
 385 390 395 400
 gat tta ctc aaa gcc aaa ccg aat tga 1227
 Asp Leu Leu Lys Ala Lys Pro Asn

69

70

405

<210> 8

<211> 408

<212> PRT

<213> *Pseudomonas alcaligenes*

<400> 8

```

Met Ile Asp Thr Ile Ala Ile Ile Gly Ala Gly Leu Ala Gly Ser Thr
  1             5             10             15
Ala Ala Arg Ala Leu Arg Ala Gln Gly Tyr Glu Gly Arg Ile His Leu
      20             25             30
Leu Gly Asp Glu Ser His Gln Ala Tyr Asp Arg Thr Thr Leu Ser Lys
      35             40             45
Thr Val Leu Ala Gly Glu Gln Pro Glu Pro Pro Ala Ile Leu Asp Ser
      50             55             60
Ala Trp Tyr Ala Ser Ala His Val Asp Val Gln Leu Gly Arg Arg Val
      65             70             75             80
Ser Cys Leu Asp Leu Ala Asn Arg Gln Ile Gln Phe Glu Ser Gly Ala
      85             90             95
Pro Leu Ala Tyr Asp Arg Leu Leu Leu Ala Thr Gly Ala Arg Ala Arg
      100            105            110
Arg Met Ala Ile Arg Gly Gly Asp Leu Ala Gly Ile His Thr Leu Arg
      115            120            125
Asp Leu Ala Asp Ser Gln Ala Leu Arg Gln Ala Leu Gln Pro Gly Gln
      130            135            140
Ser Leu Val Ile Val Gly Gly Gly Leu Ile Gly Cys Glu Val Ala Thr
      145            150            155            160
Thr Ala Arg Lys Leu Ser Val His Val Thr Ile Leu Glu Ala Gly Asp
      165            170            175
Glu Leu Leu Val Arg Val Leu Gly His Arg Thr Gly Ala Trp Cys Arg
      180            185            190
Ala Glu Leu Glu Arg Met Gly Val Arg Val Glu Arg Asn Ala Gln Ala
      195            200            205
Ala Arg Phe Glu Gly Gln Gly Gln Val Arg Ala Val Ile Cys Ala Asp
      210            215            220
Gly Arg Arg Val Pro Ala Asp Val Val Leu Val Ser Ile Gly Ala Glu
      225            230            235            240
Pro Ala Asp Glu Leu Ala Arg Ala Ala Gly Ile Ala Cys Ala Arg Gly
      245            250            255
Val Leu Val Asp Ala Thr Gly Ala Thr Ser Cys Pro Glu Val Phe Ala
      260            265            270
Ala Gly Asp Val Ala Ala Trp Pro Leu Arg Gln Gly Gly Gln Arg Ser
      275            280            285
Leu Glu Thr Tyr Leu Asn Ser Gln Met Glu Ala Glu Ile Ala Ala Ser
      290            295            300
Ala Met Leu Ser Gln Pro Val Pro Ala Pro Gln Val Pro Thr Ser Trp
      305            310            315            320
Thr Glu Ile Ala Gly His Arg Ile Gln Met Ile Gly Asp Ala Glu Gly
      325            330            335
Pro Gly Glu Ile Val Val Arg Gly Asp Ala Gln Ser Gly Gln Pro Ile
      340            345            350

```

71

72

Val Leu Leu Arg Leu Leu Asp Gly Cys Val Glu Ala Ala Thr Ala Ile
 355 360 365
 Asn Ala Thr Arg Glu Phe Ser Val Ala Thr Arg Leu Val Gly Thr Arg
 370 375 380
 Val Ser Val Ser Ala Glu Gln Leu Gln Asp Val Gly Ser Asn Leu Arg
 385 390 395 400
 Asp Leu Leu Lys Ala Lys Pro Asn
 405

<210> 9

<211> 1377

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1377)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: modified

dioxxygenase gene derived from *P. pseudoalcaligenes*

<400> 9

atg agc tca gca atc aaa gaa gtg cag gga gcc cct gtg aag tgg gtt	48
Met Ser Ser Ala Ile Lys Glu Val Gln Gly Ala Pro Val Lys Trp Val	
1 5 10 15	
acc aat tgg acg ccg gag gcg atc cgg ggg ttg gtc gat cag gaa aaa	96
Thr Asn Trp Thr Pro Glu Ala Ile Arg Gly Leu Val Asp Gln Glu Lys	
20 25 30	
ggg ctg ctt gat cca cgc atc tac gcc gat cag agt ctt tat gag ctg	144
Gly Leu Leu Asp Pro Arg Ile Tyr Ala Asp Gln Ser Leu Tyr Glu Leu	
35 40 45	
gag ctt gag cgg gtt ttt ggt cgc tct tgg ctg tta ctt ggg cac gag	192
Glu Leu Glu Arg Val Phe Gly Arg Ser Trp Leu Leu Leu Gly His Glu	
50 55 60	
agt cat gtg cct gaa acc ggg gac ttc ctg gcc act tac atg ggc gaa	240
Ser His Val Pro Glu Thr Gly Asp Phe Leu Ala Thr Tyr Met Gly Glu	
65 70 75 80	
gat ccg gtg gtt atg gtg cga cag aaa gac aag agc atc aag gtg ttc	288
Asp Pro Val Val Met Val Arg Gln Lys Asp Lys Ser Ile Lys Val Phe	
85 90 95	
ctg aac cag tgc cgg cac cgc ggc atg cgt atc tgc cgc tcg gac gcc	336
Leu Asn Gln Cys Arg His Arg Gly Met Arg Ile Cys Arg Ser Asp Ala	
100 105 110	
ggc aac gcc aag gct ttc acc tgc agc tat cac ggc tgg gcc tac gac	384
Gly Asn Ala Lys Ala Phe Thr Cys Ser Tyr His Gly Trp Ala Tyr Asp	
115 120 125	
atc gcc ggc aag ctg gtg aac gtg ccg ttc gag aag gaa gcc ttt tgc	432
Ile Ala Gly Lys Leu Val Asn Val Pro Phe Glu Lys Glu Ala Phe Cys	
130 135 140	
gac aag aaa gaa ggc gac tgc ggc ttt gac aag gcc gaa tgg ggc ccg	480
Asp Lys Lys Glu Gly Asp Cys Gly Phe Asp Lys Ala Glu Trp Gly Pro	
145 150 155 160	
ctc cag gca cgc gtg gca acc tac aag ggc ctg gtc ttt gcc aac tgg	528

73

74

Leu Gln Ala Arg Val Ala Thr Tyr Lys Gly Leu Val Phe Ala Asn Trp	
165 170 175	
gat gtg cag gcg cca gac ctg gag acc tac ctc ggt gac gcc cgc ccc	576
Asp Val Gln Ala Pro Asp Leu Glu Thr Tyr Leu Gly Asp Ala Arg Pro	
180 185 190	
tat atg gac gtc atg ctg gat cgc acg ccg gcc ggg act gtg gcc atc	624
Tyr Met Asp Val Met Leu Asp Arg Thr Pro Ala Gly Thr Val Ala Ile	
195 200 205	
ggc ggc atg cag aag tgg gtg att ccg tgc aac tgg aag ttt gcc gcc	672
Gly Gly Met Gln Lys Trp Val Ile Pro Cys Asn Trp Lys Phe Ala Ala	
210 215 220	
gag cag ttc tgc agt gac atg tac cac gcc ggc acc atg tcg cac ctg	720
Glu Gln Phe Cys Ser Asp Met Tyr His Ala Gly Thr Met Ser His Leu	
225 230 235 240	
tcc ggc atc ctg gcg ggc atg ccg ccg gaa atg gac ctc tcc cag gcg	768
Ser Gly Ile Leu Ala Gly Met Pro Pro Glu Met Asp Leu Ser Gln Ala	
245 250 255	
cag ata ccc acc aag ggc aat cag ttc cgg gcc gct tgg ggc ggc cac	816
Gln Ile Pro Thr Lys Gly Asn Gln Phe Arg Ala Ala Trp Gly Gly His	
260 265 270	
ggc tcg ggc tgg tat gtc gac gag ccg ggc atg ctc atg gcg gtg atg	864
Gly Ser Gly Trp Tyr Val Asp Glu Pro Gly Met Leu Met Ala Val Met	
275 280 285	
ggg ccc aag gtc acc cag tac tgg acc gaa ggt ccg gct gcc gac ctg	912
Gly Pro Lys Val Thr Gln Tyr Trp Thr Glu Gly Pro Ala Ala Asp Leu	
290 295 300	
gca gaa cag cga ctg ggc cac acc atg ccg gtt cga cgc atg ttc ggc	960
Ala Glu Gln Arg Leu Gly His Thr Met Pro Val Arg Arg Met Phe Gly	
305 310 315 320	
cag cac atg agc gtc ttc ccg acc tgc tcg ttc ctc ccg gcc atc aac	1008
Gln His Met Ser Val Phe Pro Thr Cys Ser Phe Leu Pro Ala Ile Asn	
325 330 335	
acc atc cgg acc tgg cac ccg cgc ggc ccc aac gaa atc gaa gtg tgg	1056
Thr Ile Arg Thr Trp His Pro Arg Gly Pro Asn Glu Ile Glu Val Trp	
340 345 350	
gcc ttc acc ttg gtc gat gcc gat gcc ccg gcc gag atc aag gaa gaa	1104
Ala Phe Thr Leu Val Asp Ala Asp Ala Pro Ala Glu Ile Lys Glu Glu	
355 360 365	
tat cgc cgg cac aac atc cgc acc ttc tcc gca ggc ggc gtg ttt gag	1152
Tyr Arg Arg His Asn Ile Arg Thr Phe Ser Ala Gly Gly Val Phe Glu	
370 375 380	
cag gac gat ggc gag aac tgg gtg gag atc cag aag ggg cta cgt ggg	1200
Gln Asp Asp Gly Glu Asn Trp Val Glu Ile Gln Lys Gly Leu Arg Gly	
385 390 395 400	
tac aag gcc aag agc cag ccg ctc aat gcc cag atg ggc ctg ggt ccg	1248
Tyr Lys Ala Lys Ser Gln Pro Leu Asn Ala Gln Met Gly Leu Gly Arg	
405 410 415	
tcg cag acc ggt cac cct gat ttt cct ggc aac gtc ggc tac gtc tac	1296
Ser Gln Thr Gly His Pro Asp Phe Pro Gly Asn Val Gly Tyr Val Tyr	

75

76

420 425 430
 gcc gaa gaa gcg gcg cgg ggt atg tat cac cac tgg atg cgc atg atg 1344
 Ala Glu Glu Ala Ala Arg Gly Met Tyr His His Trp Met Arg Met Met
 435 440 445
 tcc gag ccc agc tgg gcc acg ctc aag ccc tga 1377
 Ser Glu Pro Ser Trp Ala Thr Leu Lys Pro
 450 455
 <210> 10
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <223> Description of Artificial Sequence: modified
 dioxygenase gene derived from *P. pseudoalcaligenes*
 <400> 10
 Met Ser Ser Ala Ile Lys Glu Val Gln Gly Ala Pro Val Lys Trp Val
 1 5 10 15
 Thr Asn Trp Thr Pro Glu Ala Ile Arg Gly Leu Val Asp Gln Glu Lys
 20 25 30
 Gly Leu Leu Asp Pro Arg Ile Tyr Ala Asp Gln Ser Leu Tyr Glu Leu
 35 40 45
 Glu Leu Glu Arg Val Phe Gly Arg Ser Trp Leu Leu Leu Gly His Glu
 50 55 60
 Ser His Val Pro Glu Thr Gly Asp Phe Leu Ala Thr Tyr Met Gly Glu
 65 70 75 80
 Asp Pro Val Val Met Val Arg Gln Lys Asp Lys Ser Ile Lys Val Phe
 85 90 95
 Leu Asn Gln Cys Arg His Arg Gly Met Arg Ile Cys Arg Ser Asp Ala
 100 105 110
 Gly Asn Ala Lys Ala Phe Thr Cys Ser Tyr His Gly Trp Ala Tyr Asp
 115 120 125
 Ile Ala Gly Lys Leu Val Asn Val Pro Phe Glu Lys Glu Ala Phe Cys
 130 135 140
 Asp Lys Lys Glu Gly Asp Cys Gly Phe Asp Lys Ala Glu Trp Gly Pro
 145 150 155 160
 Leu Gln Ala Arg Val Ala Thr Tyr Lys Gly Leu Val Phe Ala Asn Trp
 165 170 175
 Asp Val Gln Ala Pro Asp Leu Glu Thr Tyr Leu Gly Asp Ala Arg Pro
 180 185 190
 Tyr Met Asp Val Met Leu Asp Arg Thr Pro Ala Gly Thr Val Ala Ile
 195 200 205
 Gly Gly Met Gln Lys Trp Val Ile Pro Cys Asn Trp Lys Phe Ala Ala
 210 215 220
 Glu Gln Phe Cys Ser Asp Met Tyr His Ala Gly Thr Met Ser His Leu
 225 230 235 240
 Ser Gly Ile Leu Ala Gly Met Pro Pro Glu Met Asp Leu Ser Gln Ala
 245 250 255
 Gln Ile Pro Thr Lys Gly Asn Gln Phe Arg Ala Ala Trp Gly Gly His
 260 265 270
 Gly Ser Gly Trp Tyr Val Asp Glu Pro Gly Met Leu Met Ala Val Met

77

78

275 280 285
 Gly Pro Lys Val Thr Gln Tyr Trp Thr Glu Gly Pro Ala Ala Asp Leu
 290 295 300
 Ala Glu Gln Arg Leu Gly His Thr Met Pro Val Arg Arg Met Phe Gly
 305 310 315 320
 Gln His Met Ser Val Phe Pro Thr Cys Ser Phe Leu Pro Ala Ile Asn
 325 330 335
 Thr Ile Arg Thr Trp His Pro Arg Gly Pro Asn Glu Ile Glu Val Trp
 340 345 350
 Ala Phe Thr Leu Val Asp Ala Asp Ala Pro Ala Glu Ile Lys Glu Glu
 355 360 365
 Tyr Arg Arg His Asn Ile Arg Thr Phe Ser Ala Gly Gly Val Phe Glu
 370 375 380
 Gln Asp Asp Gly Glu Asn Trp Val Glu Ile Gln Lys Gly Leu Arg Gly
 385 390 395 400
 Tyr Lys Ala Lys Ser Gln Pro Leu Asn Ala Gln Met Gly Leu Gly Arg
 405 410 415
 Ser Gln Thr Gly His Pro Asp Phe Pro Gly Asn Val Gly Tyr Val Tyr
 420 425 430
 Ala Glu Glu Ala Ala Arg Gly Met Tyr His His Trp Met Arg Met Met
 435 440 445
 Ser Glu Pro Ser Trp Ala Thr Leu Lys Pro
 450 455
 <210> 11
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> Burkholderia cepacia
 <400> 11
 Met Ser Ser Ala Ile Lys Glu Val Gln Gly Ala Pro Val Lys Trp Val
 1 5 10 15
 Thr Asn Trp Thr Pro Glu Ala Ile Arg Gly Leu Val Asp Gln Glu Lys
 20 25 30
 Gly Leu Leu Asp Pro Arg Ile Tyr Ala Asp Gln Ser Leu Tyr Glu Leu
 35 40 45
 Glu Leu Glu Arg Val Phe Gly Arg Ser Trp Leu Leu Leu Gly His Glu
 50 55 60
 Ser His Val Pro Glu Thr Gly Asp Phe Leu Ala Thr Tyr Met Gly Glu
 65 70 75 80
 Asp Pro Val Val Met Val Arg Gln Lys Asp Lys Ser Ile Lys Val Phe
 85 90 95
 Leu Asn Gln Cys Arg His Arg Gly Met Arg Ile Cys Arg Ser Asp Ala
 100 105 110
 Gly Asn Ala Lys Ala Phe Thr Cys Ser Tyr His Gly Trp Ala Tyr Asp
 115 120 125
 Ile Ala Gly Lys Leu Val Asn Val Pro Phe Glu Lys Glu Ala Phe Cys
 130 135 140
 Asp Lys Lys Glu Gly Asp Cys Gly Phe Asp Lys Ala Glu Trp Gly Pro
 145 150 155 160
 Leu Gln Ala Arg Val Ala Thr Tyr Lys Gly Leu Val Phe Ala Asn Trp
 165 170 175

Asp Val Gln Ala Pro Asp Leu Glu Thr Tyr Leu Gly Asp Ala Arg Pro
 180 185 190
 Tyr Met Asp Val Met Leu Asp Arg Thr Pro Ala Gly Thr Val Ala Ile
 195 200 205
 Gly Gly Met Gln Lys Trp Val Ile Pro Cys Asn Trp Lys Phe Ala Ala
 210 215 220
 Glu Gln Phe Cys Ser Asp Met Tyr His Ala Gly Thr Thr Thr His Leu
 225 230 235 240
 Ser Gly Ile Leu Ala Gly Ile Pro Pro Glu Met Asp Leu Ser His Ala
 245 250 255
 Gln Val Pro Thr Lys Gly Asn Gln Phe Arg Ala Gly Trp Gly Gly His
 260 265 270
 Gly Ser Gly Trp Phe Val Asp Glu Pro Gly Ser Leu Leu Ala Val Met
 275 280 285
 Gly Pro Lys Val Thr Gln Tyr Trp Thr Glu Gly Pro Ala Ala Glu Leu
 290 295 300
 Ala Glu Gln Arg Leu Gly His Thr Gly Met Pro Val Arg Arg Met Val
 305 310 315 320
 Gly Gln His Met Thr Ile Phe Pro Thr Cys Ser Phe Leu Pro Thr Phe
 325 330 335
 Asn Asn Ile Arg Ile Trp His Pro Arg Gly Pro Asn Glu Ile Glu Val
 340 345 350
 Trp Ala Phe Thr Leu Val Asp Ala Asp Ala Pro Ala Glu Ile Lys Glu
 355 360 365
 Glu Tyr Arg Arg His Asn Ile Arg Asn Phe Ser Ala Gly Gly Val Phe
 370 375 380
 Glu Gln Asp Asp Gly Glu Asn Trp Val Glu Ile Gln Lys Gly Leu Arg
 385 390 395 400
 Gly Tyr Lys Ala Lys Ser Gln Pro Leu Asn Ala Gln Met Gly Leu Gly
 405 410 415
 Arg Ser Gln Thr Gly His Pro Asp Phe Pro Gly Asn Val Gly Tyr Val
 420 425 430
 Tyr Ala Glu Glu Ala Ala Arg Gly Met Tyr His His Trp Met Arg Met
 435 440 445
 Met Ser Glu Pro Ser Trp Ala Thr Leu Lys Pro
 450 455

【図面の簡単な説明】

【図 1】 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF 707 株
 由来のビフェニルジオキシゲナーゼが認識できる基質お
 よびその反応産物を示した図である。

【図 2】 *Burkholderia cepacia* LB400 株由来のビフェ
 ニルジオキシゲナーゼが認識できる基質およびその反応
 産物を示した図である。

【図 3】 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF 707 株
 由来の α サブユニット (KF 707)、*Burkholderia c*
epacia LB400 株由来の α サブユニット (LB 40
 0)、および改変された *Pseudomonas pseudoalcaligene*
s KF 707 株由来の α サブユニット (2072) のア
 ミノ酸配列を整列させた図である。

【図 4】 本発明において基質として用いることができる
 複素環化合物の化学構造式を示した図である。

【図 5】 本発明において基質として用いることができる
 複素環化合物の化学構造式を示した図である。

【図 6】 本発明において変換産物として得ることができ
 る複素環化合物の化学構造式を示した図である。

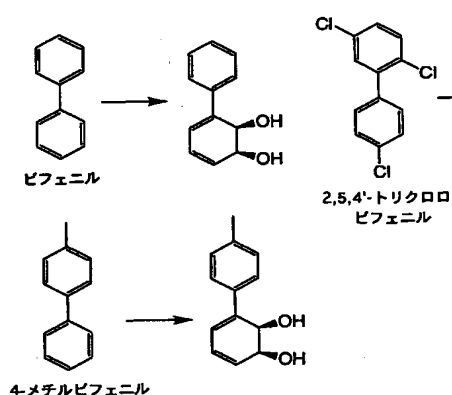
【図 7】 本発明において変換産物として得ることができ
 る複素環化合物の化学構造式を示した図である。

【図 8】 本発明において基質として用いることができる
 フラボノイド、芳香環を有するフタルイミド誘導体、芳
 香族カルボン酸の化学構造式を示した図である。

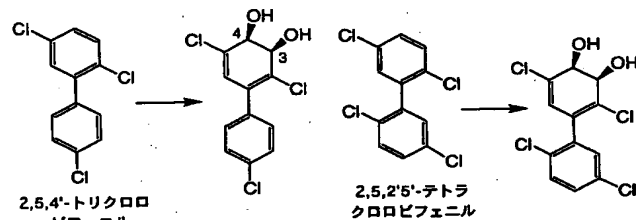
【図 9】 本発明において変換産物として得ることができ
 るフラボノイド、芳香環を有するフタルイミド誘導体、

芳香族カルボン酸の化学構造式を示した図である。

【図 1】



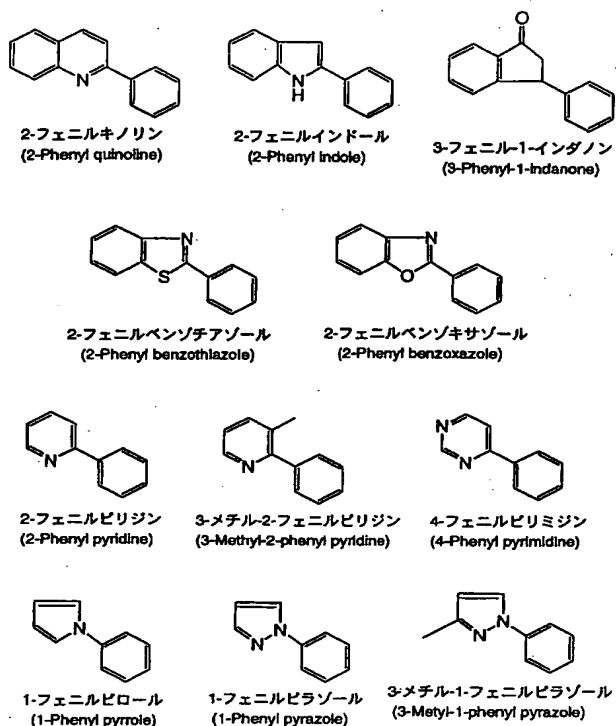
【図 2】



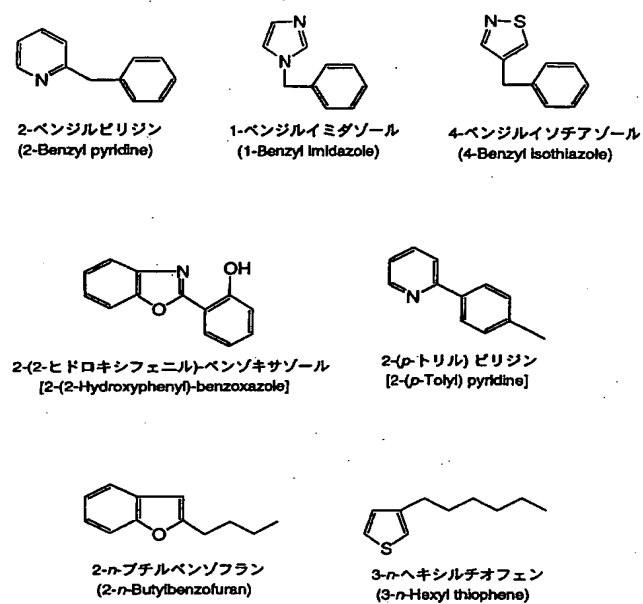
【図 3】

	10	20	30	40	50	
BphA1 (2072)	1 MSSAIKEVOG	AEVKWVNWNI	PEAIRGLVDQ	EKGLLDPRIT	ADQSLYELEI	50
BphA1 (KF707)	1 MSSAIKEVOG	AEVKWVNWNI	PEAIRGLVDQ	EKGLLDPRIT	ADQSLYELEI	50
BphA (LB400)	1 MSSAIKEVOG	AEVKWVNWNI	PEAIRGLVDQ	EKGLLDPRIT	ADQSLYELEI	50
	60	70	80	90	100	
BphA1 (2072)	51 ERVFGRSNEL	LGHESHVPET	GDFLATYMG	DPVAVRQXKI	KSIKVFNLQO	100
BphA1 (KF707)	51 ERVFGRSNEL	LGHESHVPET	GDFLATYMG	DPVAVRQXKI	KSIKVFNLQO	100
BphA (LB400)	51 ERVFGRSNEL	LGHESHVPET	GDFLATYMG	DPVAVRQXKI	KSIKVFNLQO	100
	110	120	130	140	150	
BphA1 (2072)	101 RHRGMRICRS	DAGNAKAFTC	SYHGWAYDIE	GKLVNVPFER	EAFCEKKEGI	150
BphA1 (KF707)	101 RHRGMRICRS	DAGNAKAFTC	SYHGWAYDIE	GKLVNVPFER	EAFCEKKEGI	150
BphA (LB400)	101 RHRGMRICRS	DAGNAKAFTC	SYHGWAYDIE	GKLVNVPFER	EAFCEKKEGI	150
	160	170	180	190	200	
BphA1 (2072)	151 CGFDKAEAGE	LQARVATYKG	LWFANWDVQA	PDLETYLGDY	RPYIMWMLDF	200
BphA1 (KF707)	151 CGFDKAEAGE	LQARVATYKG	LWFANWDVQA	PDLETYLGDY	RPYIMWMLDF	200
BphA (LB400)	151 CGFDKAEAGE	LQARVATYKG	LWFANWDVQA	PDLETYLGDY	RPYIMWMLDF	200
	210	220	230	240	250	
BphA1 (2072)	201 TPAGTVAIGG	MOKWVIECNM	KPAARQFCSE	MYHAGTMSHL	SGILAGMPFE	250
BphA1 (KF707)	201 TPAGTVAIGG	MOKWVIECNM	KPAARQFCSE	MYHAGTMSHL	SGILAGMPFE	250
BphA (LB400)	201 TPAGTVAIGG	MOKWVIECNM	KPAARQFCSE	MYHAGTMSHL	SGILAGMPFE	250
	260	270	280	290	300	
BphA1 (2072)	251 MDLSQAQIPT	KGNQFRFAAG	GHGSGWYVDE	EGMLMAVMGE	KVTOYATEGE	300
BphA1 (KF707)	251 MDLSQAQIPT	KGNQFRFAAG	GHGSGWYVDE	EGMLMAVMGE	KVTOYATEGE	300
BphA (LB400)	251 MDLSQAQIPT	KGNQFRFAAG	GHGSGWYVDE	EGMLMAVMGE	KVTOYATEGE	300
	310	320	330	340	350	
BphA1 (2072)	301 RADLAECRIG	HI-MIVRRRIE	GOHMSVFPTC	SFLPAINTIF	TWHPRGPNIE	350
BphA1 (KF707)	301 RADLAECRIG	HI-MIVRRRIE	GOHMSVFPTC	SFLPAINTIF	TWHPRGPNIE	350
BphA (LB400)	301 RADLAECRIG	HI-MIVRRRIE	GOHMSVFPTC	SFLPAINTIF	TWHPRGPNIE	350
	360	370	380	390	400	
BphA1 (2072)	351 EVWAFITLVA	DAPAEIKKEE	RRHNIRTFSA	GGVFECDDGE	NWVEIQKGLF	400
BphA1 (KF707)	351 EVWAFITLVA	DAPAEIKKEE	RRHNIRTFSA	GGVFECDDGE	NWVEIQKGLF	400
BphA (LB400)	351 EVWAFITLVA	DAPAEIKKEE	RRHNIRTFSA	GGVFECDDGE	NWVEIQKGLF	400
	410	420	430	440	450	
BphA1 (2072)	401 GYKAKSQPLN	AQMGLGRSQI	GHDFPGNVG	VVYABEAARG	MYHHWNRNMG	450
BphA1 (KF707)	401 GYKAKSQPLN	AQMGLGRSQI	GHDFPGNVG	VVYABEAARG	MYHHWNRNMG	450
BphA (LB400)	401 GYKAKSQPLN	AQMGLGRSQI	GHDFPGNVG	VVYABEAARG	MYHHWNRNMG	450
	460	470	480	490	500	
BphA1 (2072)	451 EPSWATLKEI	500
BphA1 (KF707)	451 EPSWATLKEI	500
BphA (LB400)	451 EPSWATLKEI	500

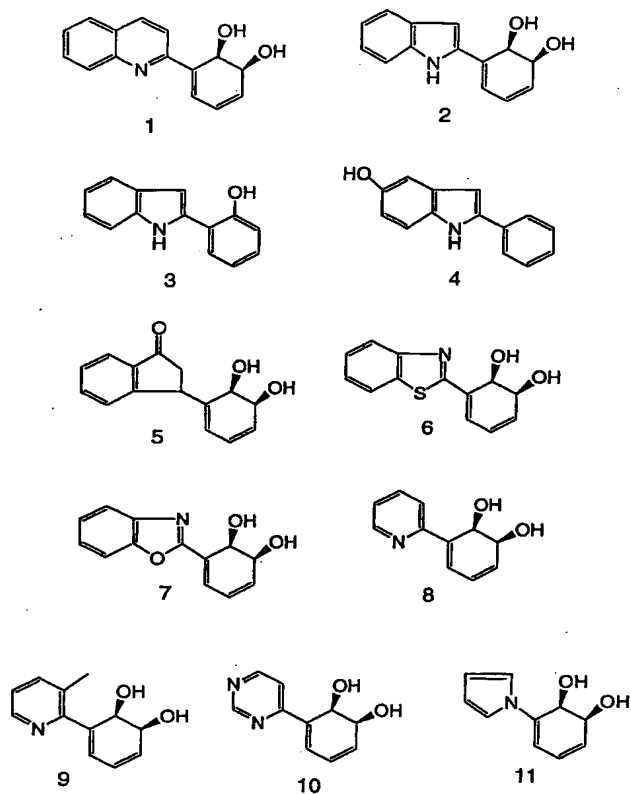
【図 4】



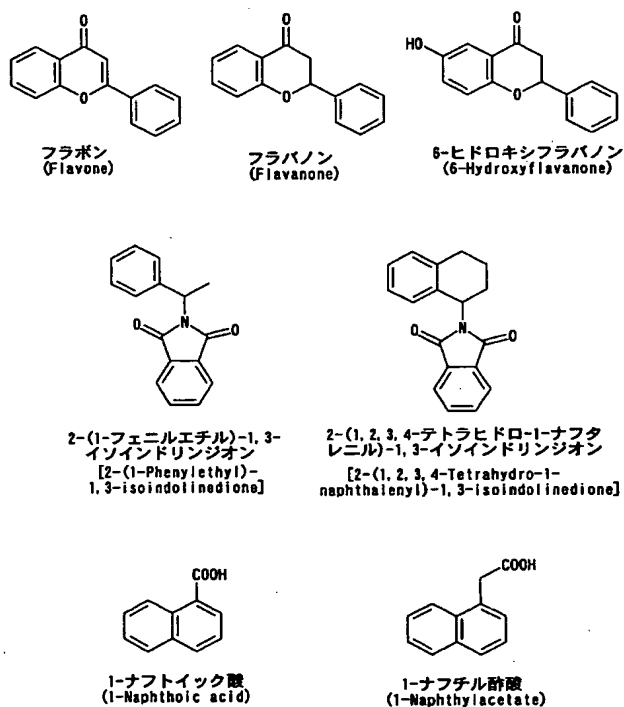
【図 5】



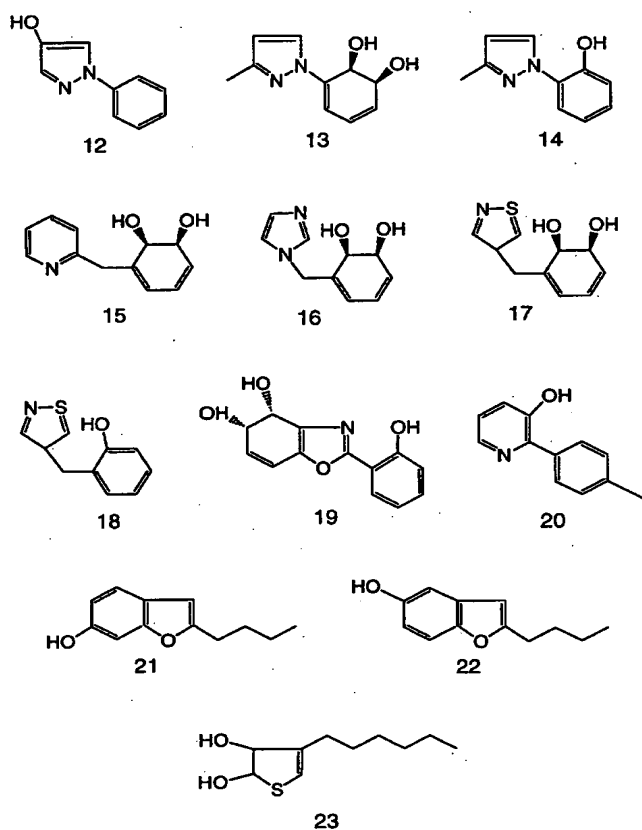
【図 6】



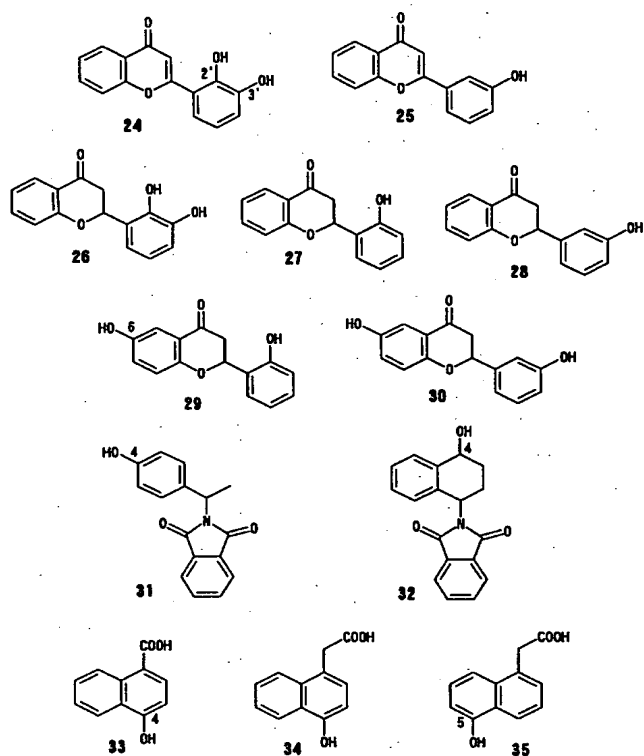
【図 8】



【図 7】



【図 9】



フロントページの続き

(72)発明者 岡 崎 寛
東京都渋谷区神宮前 6-26-1 麒麟麦酒
株式会社内
(72)発明者 古 川 謙 介
福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1 九州大
学大学院 5 号館内

(72)発明者 堀之内 末 治
東京都文京区弥生 1-1-1 東京大学大
学院農学生命科学研究科内
F ターム (参考) 4B024 AA01 BA08 DA06 DA08 DA12
HA03
4B050 CC04 DD02 EE10 LL05
4B064 AD43 AE43 CA02 CA03 CA06
CA19 CA21 CB12 DA01